MEDEDEELINGEN

VAN HET

PHYTOPATHOLOGISCH LABORATORIUM „WILLIE COMMELIN SCHOLTEN"

BAARN.

XIII. NOVEMBER 1934.

1. UNTERSUCHUNGEN ÜBER KRANKHEITEN DER GRÄSER, von A. VAN LUIJK.

2. PYTHIUM DE BARYANUM HESSE EMEND. DE BARY, von A. VAN LUIJK.

3. DIE SYMPTOME DES BORMANGELS BEI ZEA MAIS von J. VAN OVERBEEK.

4. THE AREA OF DISTRIBUTION OF THE CERATOSTO, MELLA (GRAPHIUM) ELM DISEASE, by CHRISTINE J. BUISMAN.

5. DEVELOPMENT OF ACTINOMYCES MACULATUS MILLARD IN VARIOUS NUTRITIVE SOLUTIONS, by J. B. THOMAS.

N. V. HOLLANDIA-DRUKKERIJ — BAARN

UNTERSUCHUNGEN ÜBER KRANKHEITEN DER GRÄSER

VON

A. VAN LUIJK.

EINFÜHRUNG.

Auf Gras- und Golfplätzen in Holland sieht man häufig grössere oder kleinere Stellen, wo das Gras ganz oder zum grössten Teil abgestorben ist. Diese Erscheinung wird in Amerika als „large brown patch" bezeichnet. Ausserdem finden sich an den gleichen Plätzen kleine, runde Stellen, etwa von der Grösse eines Dollars, die im Gegensatz zu der erstgenannten Krankheit als „small brown patch" bezeichnet werden. Diese letztere Erscheinung habe ich in Holland nur auf Golfplätzen beobachtet.

Es gibt noch keine ausführliche Literatur über diese Krankheiten. Rhizoctonia solani ist am häufigsten als Ursache der „large brown patch" betrachtet worden. Piper and Coe (1919), Dickinson (1930), Weber (1931), Sampson (1931) nennen diesen Pilz als die Ursache oder eine der Ursachen. Daneben werden jedoch besonders in letzter Zeit auch andre Pilze genannt. Sampson (1931) betrachtet *Fusarium nivale* als einen wichtigen Parasiten, Dahl nennt *Fusarium* spp., Monteith (1933) *Pythium Butleri*. *Helminthosporium giganteum* wird von Dahl (1933) und *Helminthosporium* sp. in dem Report of the Director of the Connecticut Agr. Exp. Stat. (1930) angeführt. Sampson (1931) erwähnt auch noch *Corticium fuciforme* als einen der von ihr beobachteten Schädlinge.

Die älteste Angabe über „small brown patch" ist wahrscheinlich eine kurze Notiz von Osmun and Krout (1918). Sie sprechen von „small, usually circular areas". Als Ursache wird von Ihnen

Sclerotium sp. angesehen. Später nennt Weber (1931) *Rhizoctonia* sp. als Urheber dieser Krankheit.

Einige Parasiten, die bei Wiesengräsern beschrieben sind, können vielleicht auch auf Golfplätzen und Rasenflächen als Schädlinge auftreten. Dieses ist z.B. mit *Helminthosporium vagans* (Drechsler 1930), *Typula graminum* und einigen anderen Sklerotien bildenden Pilzen (Hungerford, 1933) der Fall. Höhnk (1932) isolierte aus Wiesenboden das von ihm neubeschriebene *Pythium epigynum*. Der Pilz erwies sich als schädlich für Keimpflanzen.

Es erschien uns wünschenswert die Krankheiten auf Rasenflächen näher zu untersuchen, um so mehr, als es sich zeigte, dass diese auf unseren holländischen Sandböden sehr häufig sind. Auch die Golfplätze, die in Holland stets mehr angelegt werden, haben sehr häufig diese schlechten Stellen im Grase. Eine sehr wichtige zusammenfassende Arbeit über alle diese Krankheiten der Gras- und Golfplätze und deren Bekämpfung ist von Monteith und Dahl 1932 veröffentlicht.

KAPITEL I.

Methodisches

§ 1. *Isolierung der Pilze.*

Aus den kranken Pflanzen und Böden habe ich eine grosse Zahl verschiedener Pilze isoliert. Neben den parasitischen Formen bekommt man bei der Isolierung selbstverständlich eine Unmenge von Saprophyten. Es ist nicht leicht, aus den ganz dünnen Wurzeln die Parasiten zu isolieren. Die Saprophyten, die sich aussen an der Wurzel befinden, wachsen auf künstlichen Nährböden meistens viel rascher als die parasitischen Pilze. Die besten Resultate sind in folgender Weise erreicht worden. In einer Glasschale werden kranke Bodenteile und Pflanzen mit Wasser übergossen. Auf dem Wasser werden desinfizierte Samen ausgestreut. Sobald die Samen keimen, werden kleine Wurzelstückchen abgetrennt, in 4-prozentiges Formalin getaucht und ohne abzuspülen auf 2-prozentigen Agar ohne Nährstoffe in Petrischalen gebracht. Meistens wächst aus den so behandelten Wurzelstückchen nur ein Pilz und dann oft ein Parasit; wachsen mehrere Pilze heraus, dann sind sie noch leicht zu trennen, da auch die Saprophyten auf zweiprozentigem Agar nicht schnell wachsen.

Auf diese Weise bekommt man meistens *Pythium-* und *Fusarium-*Arten.

Isoliert man von Wurzeln, Stengeln und Blättern so wie man sie auf den kranken Stellen im Felde findet, dann ist auch *Rhizoctonia solani* öfters vertreten. Dieser Pilz greift anscheinend die ganz jungen Pflanzen nicht so leicht an. Die verschiedenen Formen dieses Pilzes sind meist von älteren Pflanzen isoliert worden.

Viele Pilze, welche aus den kranken Pflanzen und Böden isoliert sind, habe ich auch aus Samen von *Festuca* und *Agrostis* er-

halten. Unter diesen sind *Fusarium* und *Helminthosporium*-Arten häufig vertreten. Aber auch *Rhizoctonia solani* und zwar wohl die am meisten virulente Form ist aus Grasssamen isoliert worden.

Die isolierten Pilze sind noch nicht alle auf ihren Parasitismus geprüft worden. Von zahlreichen Formen ist jedoch festgestellt, dass sie unter bestimmten Umständen mehr oder weniger stark schädigend auftreten können. Hierbei treten *Rhizoctonia solani* und *Pythium*-Arten in den Vordergrund. Mit den isolierten *Fusarium*-Arten sind noch keine ausführlichen Versuche gemacht. Sicherlich muss ein Teil der Schädigungen auf den Rasen diesen Pilzen zugeschrieben werden. *Sclerotium*- und *Helminthosporium*-Arten können gelegentlich ebenfalls sehr schädlich sein.

§ 2. *Desinfektion der Samen.*

Für die Infektionsversuche in Reinkulturen war es notwendig, die Samen zuerst vollständig zu desinfizieren. Für unseren Zweck hat sich folgende Methode am besten bewährt:

Die Samen werden mit 96% Alkohol übergossen; die brauchbaren Samen sinken zu Boden, die tauben schwimmen oben, und werden entfernt. Sodann werden die Samen getrocknet und trocken aufbewahrt. Vor der Aussaat werden sie mit einer 0.1% Sublimatlösung in 96% Alkohol benetzt. Sie werden dann nicht mehr abgespült, sondern möglichst schnell getrocknet. Die Samen der bei diesen Versuchen gebrauchten *Festuca-*, *Agrostis-*, und *Poa*-Arten sind, wenn sie in dieser Weise desinfiziert werden, fast ganz pilz- und bakterienfrei. Nur ein Bruchteil eines Prozents dieser Samen zeigt noch Pilz- oder Bakterienwuchs. Die Keimkraft und Keimenergie dagegen werden nicht erheblich geschädigt.

Die grösseren Samen von *Lolium annuum* jedoch, werden bei gleicher Konzentration des Alkohol-Sublimats nicht genügend entkeimt. Die meisten Samen zeigten bei dem Keimversuch auf Agarboden noch Bakterienwuchs. In diesem Fall war eine 0.2% Lösung genügend zur vollständigen Desinfektion und übte auch keine schädliche Wirkung auf die Samen aus.

Die günstige Wirkung der alkoholischen Sublimatlösung einer wässerigen Lösung gegenüber hat zwei Ursachen. Erstens werden die Luftblasen an den rauhen Grasssamen sofort beseitigt und die

Samen also gleichmässig benetzt; zweitens erfolgt ein Eindringen der alkoholischen Sublimatlösung in die Samenhaut. Nicht nur die äusserlich anhaftenden Pilzsporen und Hyphen werden also getötet, sondern auch die Pilzteile innerhalb des Samenhautgewebes. Durch schnelles Abtrocknen wird verhütet, dass die Lösung zu weit in die Samen eindringt, wodurch diese geschädigt werden könnten.

§ 3. *Infektionsversuche in Reinkulturen.*

Die meisten bisher ausgeführten Infektionsversuche wurden an steril gezüchteten Pflanzen vorgenommen. Diese wurden dazu in kleineren oder grösseren Reagenzgläsern auf sterilisierten Knop-Agar, Sand, Garten- oder Blättererde gezüchtet. Die Züchtung auf Agarböden bietet den Vorteil, dass es leicht möglich ist, die Entwicklung der Wurzeln und deren Angriff durch Pilze zu beobachten.

Auffallend war bei diesen Infektionsversuchen, dass mehrere *Pythium*-Formen unter den gegebenen Bedingungen imstande sind, die Keimung der Samen von *Festuca duriuscula, Agrostis stolonifera* und *Lolium annuum* sehr stark zu verhindern. In einzelnen Fällen keimten nur 2% der infizierten Samen, während bei der Kontrolle 80 oder 90% keimten.

Andere Arten dieser Gattung greifen die Samen nicht so schnell an, dass die sichtbare Keimung so stark gestort wird. Sie können jedoch unter geeigneten Bedingungen in Wurzeln, Stengel oder Blätter der jungen Pflanzen eindringen und ein Absterben der erkrankten Teile und häufig der ganzen Pflanzen veranlassen.

Im allgemeinen erwiesen sich die parasitären *Pythium*-Arten als Jugendparasiten, während *Rhizoctonia, Sclerotium, Fusarium* und *Helminthosporium* die Pflanzen meistens später angreifen.

Temperatur und Feuchtigkeit spielen bei den Infektionen eine wichtige Rolle. Nach Möglichkeit wurde bei den verschiedenen Infektionsversuchen der Einfluss dieser Faktoren in Betracht gezogen. Die Zahl der für die Wurzeln und Stengel parasitären Bodenpilze ist jedoch sehr gross und die Temperaturoptima liegen weit auseinander. Bei jeder Temperatur, bei welcher Gräser wachsen können, kann man erwarten, dass der eine oder der andere oder mehrere

Pilze die Gräser, und besonders die Wurzeln, anzugreifen vermögen. Ist der Boden feucht, so bilden die Pflanzen jedoch sehr leicht immer neue Wurzeln. Die Wurzelbildung unterbleibt aber, wenn der Boden austrocknet, was auf sandigen Golf- und Rasenplätzen sehr leicht und häufig stattfindet. Demzufolge muss eine Dürre der Pflanzen auftreten, die sich dann in Form der erwähnten „braunen Stellen" äussert.

Die Keimpflanzen der *Agrostis stolonifera* können in folgender Weise stark geschädigt werden: Das lange erste Stengelglied wird bei dieser Art leicht von *Pythium* und *Fusarium* angegriffen. Ist der Boden genügend feucht, dann werden jedoch oberhalb dieses Stengelgliedes bald sekundäre Wurzeln gebildet, und die Pflanze wird nur wenig geschädigt. Ist der Boden aber oben zu trocken, dann stirbt der Keimling bald ab.

Bei übermässiger Feuchtigkeit des Bodens, kann auch oft ein starker Angriff der Gräser durch parasitische Pilze stattfinden. Dabei werden dann oft nicht nur die Wurzeln sondern auch die Stengel und Blätter angegriffen. In der bisherigen Literatur ist diese Krankheitsform mehr beachtet als der Angriff der Wurzeln durch den Parasiten. Auf trockenem Boden ist jedoch letztere mindestens ebenso wichtig.

Nach den bisher gemachten Beobachtungen ist die Temperatur ein besonders wichtiger Faktor für die Virulenz von *Rhizoctonia* und *Sclerotium*-Arten.

§ 4. *Keimung- und Wachstum fördernde Pilze.*

Beim Vergleich desinfizierter und nicht desinfizierter Samen auf sterilen Nährböden zeigt sich, dass Keimung und Wachstum nicht desinfizierter Samen immer rascher verlaufen. Wenn das Wachstum desinfizierter Samen verglichen wird auf sterilisierter und nicht-sterilisierter Erde, ist es auf nicht sterilisierte Erde immer günstiger. Eine Ausnahme bilden selbstverständlich die Fälle, in denen Samen oder Erde sehr virulente Parasiten enthalten.

Anfänglich wurde an eine Schädigung der Keimkraft und Keimenergie durch die Sublimatbehandlung oder auch an eine ungünstige Änderung des Bodens durch die hohe Temperatur beim Sterilisieren gedacht.

Bei den Infektionen in Reinkultur fanden wir jedoch wiederholt, dass mehrere Pilzformen die Samenkeimung und das Wachstum der jungen Pflanzen fördern.

Wir fanden unter diesen Bedingungen die günstige Wirkung bei einer *Phoma*- und einer *Mortierella*-Art und ausserdem bei einigen *Pythium*-Stämmen. Letztere gehören wahrscheinlich alle zur *Nematosporangium*-Gruppe und sind einander nah verwandt. Ein Teil dieser Formen gehört zu *Pythium torulosum*. Im vergleich zu den für Gräser parasitären Formen wachsen diese Formen bei niederer Temperatur (12° C.) weniger rasch.

Bei Anwendung nicht desinfizierter Samen und Erde tritt häufig keine deutlich günstige Wirkung dieser Pilze mehr hervor. Bei den *Pythium*-Formen tritt sogar bisweilen eine geringe Schädigung auf.

Die Gräser werden bei Infektionen in Reagenzgläsern meistens stärker angegriffen, wenn Samen oder Boden nicht desinfiziert worden sind. Der stärkere Angriff muss in diesen Fällen einer stimulierenden Wirkung der in den Boden enthaltenen saprophytischen Organismen auf die Agressivität der Pythien zugeschrieben werden.

Bei späteren in dieser Veröffentlichung noch nicht verarbeiteten Versuchen ist auch mit Kombinationen von parasitischen und wachstumfördernden Pilzen infiziert worden. Diese Versuche zeigten bisweilen deutlich eine stimulierende Wirkung saprophytischer Pilze auf die Schädigung durch die parasitischen Pythien. Dagegen war die schädliche Wirkung der Parasiten häufig weniger stark bei gleichzeitiger Impfung mit zwei oder mehr parasitischen Pythien.

Das Problem dieser Keimung- und Wachstumförderung durch Pilze ist noch ungeklärt. N i e t h a m m e r (1933) hat neuerdings ebenfalls eine solche Wirkung verschiedener Pilze bei verschiedenen Samenarten festgestellt. Früher haben wir auch eine sehr starke Wachstumförderung an steril gezüchteten Erdbeeren durch eine *Phoma*-Art beobachtet.

KAPITEL II.

Parasitismus der Pythium-Arten aus Golfplätzen und Rasenflächen für Wiesengräser

Die meisten bisher ausgeführten Infektionsversuche sind mit *Festuca duriuscula* und *Agrostis stolonifera* vorgenommen. Beide Arten sind für viele Pilze sehr anfällig. In der letzten Zeit haben wir nun auch mit verschiedenen isolierten *Phycomyceten*-Stämme *Lolium annuum, var. Westerwoldicum* infiziert. Bezüglich des Parasitismus dieser Bodenpilze für Wiesengräser ist noch sehr wenig bekannt. Isolierungsversuche aus kranken Stellen in Wiesen haben wir noch nicht ausführen können. Es war jedoch leicht, zur Orientierung mit den bereits vorhandenen Parasiten Infektionsversuche an einem der Wiesengräser vorzunehmen. Es ist aber nicht zu erwarten, dass auf geeigneten Wiesenböden die Gräser ebenso stark geschädigt werden, wie auf Rasen- und Golfplätzen, welche häufig auf für Gräser zu trockenen Sandboden angelegt werden. Die Wasserversorgung ist auf den Wiesenböden meistens viel besser und viel konstanter. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die besseren Futtergras-Arten empfindlicher sind als die minderwertigen Arten, und dass die Bodenpilze deshalb eine wichtige Rolle beim Verdrängen der guten durch minderwertige Arten spielen.

Die Infektionen von *Lolium annuum* haben nun gezeigt, dass auch diese Art sehr anfällig ist für die meisten *Pythium*-Arten, welche *Festuca* und *Agrostis* befallen. Die Phycomyceten, welche unter gewissen Bedingungen Keimung und Wachstum von *Festuca* und *Agrostis* beschleunigen, üben in den meisten Fällen gleiche Wirkung auf *Lolium annuum* aus.

Die an in Reinkultur gezüchteten Gräsern gelungenen Infektionsversuche beweisen, dass diese Pilze unter Umständen parasitär werden können. Damit ist jedoch nicht erklärt, welche Rolle sie

einzeln für das Hervorrufen der Krankheiten auf den Feldern spielen. Zur Beurteilung dieser Frage sind dann auch Infektionsversuche unter gewöhnlichen Bedingungen auf den Feldern notwendig.

Bei einigen Versuchen in dieser Richtung welche 1932 ausgeführt wurden, zeigte es sich jedoch, dass der zur Verfügung stehende Gartenboden durch mehrere für Gräser schädliche Bodenpilze infiziert war. Es war auf diesem Boden nicht möglich *Festuca duriuscula* und *Agrostis stolonifera* gesund su züchten. Die Kontrollen wurden ebenso krank wie die Pflanzen auf den infizierten Stücken. Es ist also für Infektionsversuche auf diesem Boden notwendig, ihn zu entkeimen. Desinfektion mit Kupfer oder Quecksilberverbindungen sind hier weniger geeignet, da eine Schädigung der zur Infektion gebrauchten Pilze zu erwarten ist. Für unseren Zweck kamen also organische Stoffe wie Formalin, u.s.w. in Betracht. Einige Versuche die noch im Jahre 1932 mit Formalin und Essigsäure ausgeführt wurden, erwiesen sich als ungenügend. Auch die stärksten, in der Literatur angegebenen Dosen genügten nicht. Die Bodenparasiten traten zwar auf den behandelten Stücken, viel weniger auf als auf den unbehandelten, aber immer noch in solchen Mengen, dass Infektionsversuche keine beweisenden Resultate liefern konnten.

Im Winter wurden dann zahlreiche Desinfektionsversuche mit verschiedenen Mitteln an krankem Boden in Reagenzgläsern vorgenommen.

Nach den damit erzielten Resultaten haben wir jetzt auch draussen im Garten, neue Desinfektionsversuche angestellt mit Formalin, Essigsäure und einer Mischung dieser beiden Stoffe mit Phenol. Dabei waren die Dosierungen des Formalins und der Essigsäure stärker, als man sie im allgemeinen gebraucht; in Uebereinstimmung damit wurde der Zeitraum zwischen Desinfektion und Aussaat vergrössert.

Infektionsversuche in Reinkulturen mit Pythium irregulare Buisman

INFEKTIONSVERSUCH I

Infektionsversuch in Reagenzgläsern auf sterilem Knop-Agar. In jedem Röhrchen 10 desinfizierte Samen von *Festuca duriuscula*. Temperatur 28° C.

1 Röhrchen infiziert mit *Pythium irregulare* Keimung in 20 Tagen 10%.
4 Röhrchen Kontrolle. Keimung 42,5%.

INFEKTIONSVERSUCH II

Infektionsversuch in Reagenzgläsern mit sterilisiertem Knop-Agar. In jedem Röhrchen 5 Samen von *Festuca duriuscula.* 13 Tage nach der Aussaat ist die Keimungszahl und die Länge der Pflanzen festgestellt. In diesen 13 Tagen schwankte die Minimum-Temperatur pro Tag von 12 bis 16,5° C., die Maximum Temperatur von 17 bis 22°.

Jede Reihe hat 10 Röhrchen, also 50 Samen. Verglichen werden desinfizierte und nicht desinfizierte Samen.

	Keimung in 13 Tagen	Gesamtlänge der Pflanzen
NICHT DESINFIZIERTE SAMEN		
Kontrolle	82%	1380 mm
Inf. *P. irregulare*	4%	8 „
DESINFIZIERTE SAMEN		
Kontrolle	70%	680 „
Inf. *P. irregulare*	26%	239 „

INFEKTIONSVERSUCH III

Infektionsversuch in Reagenzgläsern mit Sand und oben einer dünnen Schicht Blatterde, hierzu in jedem Röhrchen auf 10 c.M.^{3} Boden 3 c.M.^{3} Knop'sche Lösung zugefügt. Infektion am 3 2, 1932. Aussaat der desinfizierten Samen von *Festuca duriuscula* 18.2. Jede Reihe 10 Röhrchen, in jedem Röhrchen 5 Samen.

Keimung der Samen und totale Länge der Pflanzen in einem Monat:

	Keimung %	Länge mm.
BODEN NICHT STERILISIERT		
Kontrolle	71	2072
Inf. *Pythium irregulare*	56	1435
BODEN STERILISIERT		
Kontrolle	66	760
Inf. *Pythium irregulare*	60	931

INFEKTIONSVERSUCH IV

Reagenzgläser mit sterilisierter Gartenerde, jede Reihe 4 Röhrchen mit 10 Samen von *Festuca duriuscula.* Versuch im Zimmer.

Temperatur sehr schwankend, meistens jedoch unter Optimum. Febr.-März 1933.

Die Bedingungen für Keimung und Wachstum waren bei dieser Versuchs-

reihe weniger günstig. Die Aussaat war verzögert und aus diesem Grunde die Erde in den Röhrchen zu trocken. Verbunden mit der zu niederen Temperatur verursachte das auch bei der Kontrolle eine ungenügende Keimung. Ausserdem ist die Keimkraft der *Festuca duriuscula*-Samen 1933 weniger gut gewesen als 1932. Solche Bedingungen treten jedoch auch oft in der gewöhnlichen Kultur auf.

Kontrolle 2 Monate nach der Aussaat:

	Keimung in %	Gesamtlänge der Pflanzen
DESINFIZIERTE SAMEN		
Kontrolle	30	365
Infektion *P. irregulare*	10	54
NICHT DESINFIZIERTE SAMEN		
Kontrolle	50	1320
Infektion *P. irregulare*	7,5	190

Bei den Versuchen I bis IV war jedesmal der Boden längere oder kürzere Zeit vor der Aussaat mit dem Pilz infiziert worden. Bei dem fünften Versuch wurde die Infektion 2 Wochen nach der Keimung vorgenommen. Reagenzgläser mit Knopagar, jede Reihe 40 Pflanzen.

INFEKTIONSVERSUCH V

Kontrolle 14 Tage nach der Infektion.
Versuch bei Zimmertemperatur (10—20° C.).
Kontrollreihe alle gesund.
Inf. *P. irregulare* 1 krank?
Versuch im Gewächshaus (Temp. 22 bis 34° C.).
Kontrollreihe alle gesund.
Inf. *Pythium irregulare* 1 tot, 2 krank.

INFEKTIONSVERSUCH VI

Infektionsversuch in Simplizia Röhren in sterilisierter Gartenerde. *Lolium annuum westerwoldicum.*

Kontrollreihe 40 Samen. Infektionsreihe 20 Samen.

Infektion 2.2.—1933. Aussaat 8.2. Stark schwankende Zimmertemperatur.

	Keimung in 2 Wochen. %	Totale Länge der Pflanzen pro 20
Kontrolle	85	1375
Inf. *P. irregulare*	15	130

Die Versuche zeigen, dass *Pythium irregulare* unter sehr verschiedenen Bedingungen in Reinkultur stark parasitär auftreten kann.

Festuca duriuscula und *Lolium annuum westerwoldicum* sind beide sehr emp-

findlich. In vielen Fällen wird die Keimkraft stark herabgesetzt. Desinfektion der Samen mit Alkohol-Sublimat übt eine schützende Wirkung aus. Der Pilz ist unter den gegebenen Bedingungen hauptsächlich Jugendparasit. Infektion rief an zweiwochen alten Pflanzen keine grosse Schädigung hervor.

Bei Versuchsreihe III (Sand mit einer dünnen Schicht Blatterde in Röhrchen) war die Empfindlichkeit von *Festuca duriuscula* weniger stark als bei den anderen Reihen. Bezüglich der Pflanzenlänge war auf sterilisiertem Boden eine kleine Stimulation zu beobachten.

Dass der Pilz im Freien gelegentlich sehr schädlich sein kann, ist nach diesen Versuchen kaum anzuzweifeln.

Infektionsversuche in Reinkultur mit Pythium de Baryanum Hesse

Dieser Pilz wurde als einer der meist virulenten Parasiten aus Keimpflänzchen von *Agrostis stolonifera* isoliert.

Mit *Pythium de Baryanum* sind nur wenige Infektionsversuche gemacht worden. Bei diesen erwies sich der Pilz jedoch als einer der meist virulenten Pythien.

Bei einem Infektionsversuch in Simplicia-Röhren ist neben anderen *Pythium*-Arten auch diese zur Infektion von Lolium var. westerwoldicum gebraucht.

Während in den Kontrollröhrchen innerhalb 2 Wochen 85% der *Lolium*-Samen keimten, zeigten die mit *P. de Baryanum* infizierten Röhren nur 5% gekeimte Samen. Die durchschnittliche Gesamtlänge der Pflanzen in jeden Rohr mit 20 Samen war bei den Kontroll-Röhren 1370 mm. Für die mit *Pythium de Baryanum* infizierten Röhren was diese Zahl nur 40 mm.

Bei einer Infektion von *Festuca duriuscula* in kleineren Röhrchen ist festgestellt worden, dass die gesamtlänge der Kontrollpflanzen 365 mm. und für die Infektionsreihe nur 50 mm. war.

Ein weiterer Infektionsversuch wurde an *Agrostis stolonifera* in einem grossen Blumentopf mit sterilisierter Blatterde ausgeführt. Der Boden ist am 7.4 infiziert worden, an demselben Tag wurde die Aussaat mit desinfizierten Samen vorgenommen. Der infizierte und ein Kontroll-Topf wurden gegen Regen und Sonne geschützt aufgestellt. Die Töpfe erhielten immer gleiche Mengen Wasser. Bis zur Keimung wurde der Boden feucht gehalten; nach dieser Periode ist drei Wochen lang kein Wasser zugefügt worden. Am 10.5 waren in dem Kontrolltopf alle Pflanzen gesund. In dem infizierten Topf war eine so starke Schädigung aufgetreten, dass etwa 50% der Pflanzen abgestorben waren. Die augenscheinlich gesund gebliebenen waren erheblich kleiner als die Kontrollpflanzen. Zwei Wochen lang blieb der Unterschied sehr erheblich. Später fingen die gesundgebliebenen Pflanzen an sich zu erholen, und der Unterschied wurde kleiner.

Auf Seite 6 ist die Schädigung des ersten Stengelgliedes und das Absterben der jungen Pflanzen in trocknem Boden erwähnt. Die mit diesem Infektionsversuch erzielten Resultate bestätigen die Ansicht, dass eine starke Schädigung

dieser Grassart auftritt, wenn während der Keimung der Boden genügend feucht ist, dann aber eine trockne Periode folgt.

Nun ist in diesem Fall nicht das erste Stengelglied sondern die primäre Hauptwurzel stark geschädigt worden. Es war hier nicht sehr tief gesät worden, und unter diesen Bedingungen war das erste Stengelglied nicht sehr lang geworden. Die Folgen der Trockenheit sind für die jungen Pflanzen jedoch ebenso schlimm. Die sekundären Kronenwurzeln können wegen der Trockenheit der oberen Bodenschicht nicht gebildet werden. Die unten an den primären Wurzeln gebildeten sekundären Wurzeln können nicht nachhelfen, weil die primären Wurzeln durch Pilze angegriffen worden sind.

Infektionsversuche mit Pythium mamillatum Meurs
Infektionen in Reinkultur

Dieser Pilz zeigt sich bei dieser Methode haüfig als ein sehr virulenter Parasit.

INFEKTIONSVERSUCH 1

Jede Reihe besteht aus 10 Reagenzgläsern mit sterilem Knop-Agar, in jedem Röhrchen 5 Samen von Festuca duriuscula.

Nach einer Woche wurden die gekeimten Samen gezählt und in jedem Röhrchen der längste Stengel gemessen. Hieraus ist für die Länge der Mittelwert für die 10 Röhrchen jeder Reihe berechnet.

SAMEN NICHT DESINFIZIERT.

	Keimung	Mittlere Länge
Infektion mit *P. mamillatum*	6%	0,00 mm.
Kontrolle	72%	4,25 „

SAMEN DESINFIZIERT

	Keimung	Mittlere Länge
Infektion mit *P. mamillatum*	28%	0,30 „
Kontrolle	64%	1,60 „

3 Wochen nach der Aussaat ist wieder die Zahl der gekeimten Samen und die Gesamtlänge der Pflanzen jeder Reihe festgestellt.

SAMEN NICHT DESINFIZIERT

	Keimung	Pflanzenlänge
Infektion *P. mamillatum*	4%	43 mm.
Kontrolle	82%	2078 mm.

SAMEN DESINFIZIERT

Infektion *P. mamillatum*	44 %	594 mm.
Kontrolle	78 %	1642 mm.

INFEKTIONSVERSUCH 2

Jede Reihe enthalt 10 Röhrchen mit je 10 Samen von *Festuca duriuscula*. Infektion am 10.1. 1933. Aussaat 30.1. Zimmertemperatur. Boden: sterilisierte Gartenerde.

Bei der Kontrolle am 15.3. ist die Zahl der gekeimten Samen und die Gesamtlänge der Pflanzen für jede Reihe festgestellt.

SAMEN NICHT DESINFIZIERT

	Keimung	Länge
Infektion *P. mamillatum*.	5 %	90 mm.
Kontrolle	50 %	1320 mm.

SAMEN DESINFIZIERT

Infektion *P. mamillatum*	7,5 %	55 mm.
Kontrolle	20 %	365 mm.

Bei diesen Versuchen war der Pilz also sehr stark virulent. Bei den folgenden Versuch hat er jedoch keine deutliche Schädigung, sondern auf sterilisiertem Boden sogar eine Wachstumsteigerung verursacht.

INFEKTIONSVERSUCH 3

Jede Reihe besteht aus 10 Röhrchen mit je 5 desinfizierten Samen von *Festuca duriuscula*. Der Nährboden ist Sand; darüber eine dünne Schicht Blatterde.

Nach einem Monat ist die Zahl der gekeimten Samen und die Gesamtlänge der Pflanzen jeder Reihe festgestellt.

Boden sterilisiert	Keimung	Länge
Infektion *P. mamillatum*	56 %	1078 mm.
Kontrolle	66 %	760 „

BODEN NICHT STERILISIERT

Inf. *Pythium mamillatum*	62 %	1910 mm
Kontrolle	70 %	2071 „

INFEKTIONSVERSUCH 4

Bei diesem Versuch mit *Lolium*-Samen in Simplicia-Röhren mit sterilisierter Gartenerde als Nährboden erwies der Pilz sich auch für diese Art unter den gegebenen Bedingungen wieder als ziemlich stark virulent. Die Samenkeimung wurde weniger gehemmt als bei Versuch 1 und 2 an *Festuca duriuscula*. Das Wachstum ist aber wahrscheinlich durch Schädigung der Wurzeln ziemlich

stark beeinträchtigt. Die Kontrolle zeigte nach 2 Wochen 85% Keimung, während bei der infizierten Reihe 60% der Samen gekeimt waren. Die Gesamtlänge der Pflanzen war bei der Kontrollreihe 1370 mm bei der infizierten Reihe nur 330 mm.

Die hier erwähnten Infektionsversuche sind alle mit den erst isolierten Stamm dieser Art (Stamm 94) ausgeführt.

Pythium torulosum Coker and Patterson

Aus einer kranken Stelle eines Golfplatzes isoliert; stimmt in allen wichtigen Merkmalen mit *P. torulosum* überein. Grösse der terminalen oder interkalaren Oogonien 12.4—19.8 μ (Mittelwert aus 50 Messungen: 16.1μ). Die Oosporen füllen das ganze Oogon aus. Antheridien androgyn, meistens 1 pro Oogon; bei den interkalaren vielfach zwei: eins unterhalb, eins oberhalb des Oogons. Die „toruloid elements", so wie diese bei Matthews (1931) beschrieben und abgebildet sind, manchmal in grossen Mengen vorhanden. Sporangien und Schwärmsporen mit der Diagnose übereinstimmend. Neben den von Matthews genannten Blasen mit 15 oder mehr Sporen gab es hier auch solche mit 5—15 Sporen. Sporangien und Schwärmsporen bildeten sich bei Anwendung der bei *P. de Baryanum* beschriebenen Methode.

Nach Matthews Angaben hat Patterson festgestellt, dass der Pilz für Keimpflanzen von *Phaseolus*, *Pisum*, *Lactuca* und *Brassica* nicht parasitär ist. Nach unseren Versuchen in Reinkulturen wurden weder *Lolium*, noch *Festuca* und *Agrostis* angegriffen. Dagegen wurde mehrmals stimulierende Wirkung auf Keimung und Wachstum der Gräser beobachtet.

Auf Rasenflächen in Holland häufig vorkommend.

Pythium volutum Vanterpool and Truscott

Aus krankem Boden des Golfplatzes zu Hilversum ist eine *Pythium*-Art isoliert worden, welche sofort als verschieden von allen früher isolierten Pilzen erkannt wurde. Der Pilz hat an jedem Oogonium mehrere Antheridien und die Antheridien Stiele winden sich oft um den Oogonienstiel.

Herr Dr. Meurs, welchem ich diese Besonderheit des Pilzes zeigte, machte mich darauf aufmerksam dass *Pythium volutum* diese Eigentümlichkeit auch besitzt. Einen Vergleich des Grasspilzes mit der Diagnose von *P. volutum* und mit einer Abimpfung der Kultur dieses Pilzes aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures zeigte dass beide Pilze in vieler Hinsicht übereinstimmten. Grösse und Form der Oogonien und Oosporen stimmen, und die von den Autoren angegebenen länglichen Oosporen mit zwei „Reserveglobules" in den Zellen der Wirtspflanzen waren bei dem Graspilz ebenfalls zu beobachten. Dagegen kommen die bei dem Canadischen Pilz sehr zahlreichen sterilen Oogonien bei unserem Graspilz viel seltener vor. Bei einigen vorläufigen vergleichenden Infektionsversuchen erwiesen sich beide Pilze als parasitär für *Agrostis stolonifera*, *Festuca duriuscula* und *Lolium annuum* var. *Westerwoldicum*. Der

Canadische Pilz ist für den keimenden Samen von *Agrostis stolonifera* sehr virulent. Von 20 Samen auf Knop-Agar in einem Glassröhrchen keimte kein einziger.

Von der gleichen Zahl Samen, welche mit dem holländischen Pilz infiziert waren, keimten nur 10. Die Pflanzen erkrankten bald und erreichten eine Länge von nur 20 mm. Die Pflanzen in den Kontrollröhrchen blieben vollkommen gesund; sie wuchsen sehr gut und das Röhrchen war mit Blättern und Stengeln ganz ausgefüllt.

In diesem Fall war das canadische *Pythium volutum* also besonders für die keimenden Samen sehr virulent; die holländischen Form greift mehr die ganz jungen Pflanzen an.

Zugleich mit allen anderen von Gräsern isolierten *Pythium*-Stämmen wurden auch Infektionsversuche mit *Pythium volutum* in Lampenzylindern ausgeführt. Diese wurden mit sterilisierter Blatterde gefüllt und in den Boden gesetzt. Die Bedingungen wurden nach Möglichkeit den natürlichen Bedingungen angeglichen. Die Möglichkeit einer Fremdinfektion durch die unteren Offnungen der Gläser ist auf diese Weise nicht ausgeschlossen. Um das zu verhindern, wurde auf den Boden des für jedes Glas mit einem Bohrer gemachten Loches 10 cm^3 einer 0.25% Uspulunlösung gegossen.

Die Gläser wurden am 6.4.1933 in den Boden gesetzt und mit den verschiedenen Pilzen infiziert. Am 7.4 wurde ausgesät. Jedes Glas erhielt die gleiche Menge Samen von *Agrostis stolonifera*. Durch kaltes und trockenes Wetter wurde die Keimung sehr verzögert; erst nach einem Monat zeigten sich die ersten Keimlinge.

Bei der letzten Kontrolle am 17.5 erwies sich das canadische *Pythium volutum* als einziger Pilz, der unter diesen Bedingungen für den keimenden Samen deutlich parasitär war. In den drei mit diesem Pilz infizierten Gläsern fanden sich 0, 1 und 14 Pflanzen. Jedes der Kontrollgläser enthält etwa 50 Pflanzen. Die mit den anderen *Pythium-Stämmen* darunter auch der holländischen Form des *Pythium volutum* infizierten Pflanzen zeigen keine deutlichen Unterschiede gegenüber der Kontrolle.

Bei einem Infektionsversuch an *Lolium annuum var. Westerwoldicum*, dass in grösseren Glassröhren in Reinkultur gezüchtet worden war, erhielt man mit *Pythium volutum* eine viel weniger starke Infektion. Die holländische Form war für dieses Gras unter den gegebenen Bedingungen weniger virulent.

Zwei Wochen nach der Aussaat waren von der Kontrolle 85% der Samen gekeimt, Inf. P. vol. (Can.) 53%; Inf. P. vol. (holl.) 73%.

Bei dem gleichen Versuch setzte *Pythium de Baryanum* die Keimung bis auf 5% herab, und *Pythium irregulare* bis auf 15%.

Infektionsversuche mit Rhizoctonia Solani

In der amerikanischen Literatur wird als Ursache der Krankheitserscheinung „large brown patch" meistens *Rhizoctonia solani*, als Erreger der „small brown patch" Rhizoctonia spec. angesehen.

Wahrscheinlich ist auch in Holland *Rhizoctonia solani* eine der Ursachen der „large brown patch". Wiederholt ist von solchen Stellen der Pilz isoliert worden. Dabei fand man, dass es auf den kranken Stellen mehrere morphologisch und physiologisch verschiedene Rassen gibt. Die am meisten parasitische Form (von mir vorläufig als 120/1 unterschieden) ist von Samen isoliert. Frl. Dr. G. Bunschoten (1933) welche auch mit dieser Form arbeitete, hat sie als *Rhizoctonia solani gramineae* beschrieben.

Ein zweiter Stamm (120 c) ist ebenfalls aus Samen isoliert und steht 120/1 sehr nahe oder ist mit dieser identisch. Von 3 anderen Stämmen welche von kranken Stellen isoliert wurden, ist eine (110) von den anderen physiologisch und morphologisch deutlich verschieden. Er ist am wenigsten virulent. Die zwei anderen (105 und 112) sind vielleicht auch wieder mit einander identisch. In der Virulenz halten sie die Mitte zwischen 120/1 einerseits und 110 anderseits.

Infektionsversuch 1 mit Rhizoctonia solani und Sclerotium spec.

Die zuvor desinfizierten Samen keimten in Petrischalen mit Knop-Agar bei 23° C. Jeden Tag wurden die deutlich gekeimten Samen in Reagenzgläsern mit sterilem Knop-Agar übergeführt. In jedes Röhrchen kamen 5 Pflänzchen. Für jede Infektionsreihe wurden 9 Röhrchen, also 45 Pflanzen gebraucht.

Die Samen waren im Verlauf einer Woche gekeimt. Die Röhrchen enthielten dadurch Pflanzen verschiedener Grösse. Vor der Infektion wurden die Röhrchen nach der Pflanzengrösse in Klassen geordnet und dann in der Weise verteilt, dass sich in jeder Infektionsreihe die gleiche Zahl Pflanzen der verschiedenen Klassen befand.

Es wurde mit den 5 erwähnten *Rhizoctonia solani*-Stämmen und einem Stamm von *Sclerotium* spec. infiziert. Mit jedem Pilzstamm wurden 2 Reihen von 45 Pflanzen behandelt. Von diesen wurde die eine Reihe im Zimmer, die andere im Gewächshaus aufgestellt. An beiden Stellen schwankte während der Beobachtungszeit die Temperatur sehr stark. Es hat desshalb keinen Zweck alle Temperaturschwankungen, soweit sie festgestellt werden konnten, hier anzugeben. Nur sei erwähnt, dass während der ersten Woche nach der Infektion im Zimmer die Temperatur am Tage zwischen 17 und 39° C varierte und in der Nacht einmal bis auf 12° gefallen war.

Im Gewächshaus schwankte die Temperatur am Tage von 24 bis 42°.

Die niedrigste Temperatur im Gewächshaus während der Nacht konnte nicht festgestellt werden. Die mittlere Temperatur des Gewächshaus war etwa 3 bis 5° C höher als im Zimmer.

Die Infektion der jungen Pflanzen wurde am 17. Mai vorgenommen. Unterstehende Tabelle zeigt den Vorgang der Infektion.

ZIMMERTEMPERATUR

Zahl der kranken Pflanzen von 45 am:

		20/5	23/5	24/5	25/5	30/5
Infektion mit Stamm	112	0	7	42	43	43
	105	0	12	27	44	44
Rhiz. Sol.	110	0	4	22	28	33
	120/1	4	32	45	45	45
	120/c	1	29	44	45	45
Sclerotium spec.		1 (?)	19	29	31	43
Kontrolle		0	0	0	0	0

GEWÄCHSHAUSTEMPERATUR

Infektion mit Stamm	112	4	29	42	45	45
	105	9	39	42	42	42
Rhizoct. Sol.	110	3	26	33	36	38
	120/1	29	41	45	45	45
	120/c	21	43	45	45	45
Sclerotium spec.		0	7	15	21	36
Kontrolle		0	0	0	0	0

Es ergibt sich aus der Zahl der kranken Pflanzen am 20.5 und 23.5, dass alle *Rhizoctonia*-Stämme bei der höheren Gewächshaus-Temperatur die Pflanzen erheblich schneller krank machen.

Sclerotium spec. verhält sich dagegen in dieser Hinsicht umgekehrt.

Auffallend ist in der Tabelle der sehr starke Parasitismus der Stämme 120/1 und 120/c.

Sieben Tage nach der Infektion war unter 180 infizierten Pflanzen nur noch eine gesund. Diese erkrankt jedoch am achten Tage auch noch.

Die Pflanzen werden meistens 1 bis 2 cm. oberhalb der Nährböden von den Pilzen befallen. Sie zeigen an dieser Stelle Braunfärbung und Einschrumpfen der Stengel und Blätter. Die Blattspitzen bleiben am längsten gesund.

Bei einer weiteren ausführlichen Versuchsreihe mit denselben Pilzen sind die Infektionen zum Teil in nicht sterilisierter Gartenerde in Reagenzgläsern ausgeführt. Die Resultate stimmen sowohl hinsichtlich des Parasitismus der verschiedenen Pilzstämme als auch in ihrem Verhalten bei verschiedener Temperatur völlig mit den Resultaten auf Knop-Agar überein.

Sehr deutlich trat bei diesem Versuch noch hervor, dass die Virulenz bestimmter Pilze unter Umstände in nicht sterilisierter Erde erheblich stärker sein kann als in sterilisierter Erde.

Bei der Infektion mit dem sehr virulenten Stamm 120/1 erwiesen sich 7 Tage nach der Infektion bei höherer Temperatur in nicht sterilisierter Erde 76% der Pflanzen als krank. Bei gleicher Temperatur in sterilisierter Erde waren nur 11% erkrankt. Bei niederer Temperatur in nicht sterilisierter Erde war der Prozentsatz 26 und in sterilisierter Erde 4.

Der Unterschied kann nicht einer parasitischen Wirkung der Bodenpilze in der nicht sterilisierter Erde zugeschrieben werden, denn die Pflanzen in den Kontrollröhrchen waren zur gleichen Zeit noch vollkommen gesund. Ueberdies waren die Verhältnisse bei *Sclerotium* spec. auch in diesem Falle wieder gerade umgekehrt. Dieser Pilz war in dem sterilisierten Boden stärker parasitisch als auf dem nicht sterilisierten. Sieben Tage nach der Infektion war noch kein Erfolg festzustellen. Nach 2 Wochen war bei höherer Temperatur auf nicht sterilem Boden 11%, auf sterilem Boden 49% der Pflanzen erkrankt. Bei niederer Temperatur war der Unterschied etwas kleiner, nämlich 15% auf nicht sterilisiertem Boden gegenüber 44% auf sterilisiertem Boden.

Das Zusammenwirken der beiden Faktoren Temperatur und Bodensterilisierung ist so stark, dass bei der für diesen Pilz günstigen Kombination, nämlich niederer Temperatur und sterilisiertem Boden, Sclerotium spec. stärker parasitisch auftritt als Rhizoctonia solani 120/1. Letzterer Pilz hat bei höherer Temperatur und nicht sterilem Boden in 2 Wochen 98% der Pflanzen befallen. Bei *Sclerotium* spec. zeigten sich unter denselben Bedingungen nur 11% erkrankt. Dagegen war bei der entgegengesetzten Kombination, niederer Temperatur und sterilisiertem Boden, das Verhalten umgekehrt. Mit *Rhiz.* infiziert waren 20% krank, während *Sclerotium* unter diesen Bedingungen 43% der Pflanzen befallen hatte. Demzufolge war das meistens viel weniger virulente *Sclerotium* unter diesen Bedingungen zum stärkeren Parasiten geworden.

Auch bei anderen Versuchen haben wir wiederholt beobachten können, dass verschiedene Pilze auf nicht sterilisiertem Boden virulenter als auf sterilisiertem Boden sein können. Diese Wirkung der Bodensterilisation ist nicht leicht zu erklären. Eine ähnliche Wir-

kung der Samendesinfektion verschiedenen Pilzen gegenüber kann man einer schützenden Wirkung des Sublimats zuschreiben. Vielleicht spielen jedoch auch *hier* die Samenpilze oder Bakterien eine Rolle. Wo die Samenkeimung durch Samen- oder Bodenpilze gefördert wird, kann auch das Wachstum und vielleicht auch die Virulenz der parasitischen Pilzen stimuliert werden. In welcher Weise die Reizung zu Stande kommt, ist ein wichtiges und interessantes Problem. Die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, dass die saprophytischen Pilze verschiedene Nährstoffe für Pflanzen und für parasitische Pilze besser aufnehmbar machen können.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die in den Vereinigten Staaten als „large brown patch" und „small brown patch" bekannten Krankheitserscheinungen von Gras- und Golfplätzen, treten auch in Holland häufig auf. Aus den kranken Graspflanzen sowie aus dem Boden kranker Stellen liessen sich verschiedene parasitäre Pilze isolieren. *Pythium*-arten, *Rhizoctonia* und *Sclerotium* und *Fusarium* species treten am häufigsten auf. Infektionsversuche mit diesen Pilzen wurden an *Festuca*- und *Agrostis*-arten angestellt an sterilen Pflanzen in Vitro gezüchtet.

Diese Arten kommen häufig auf Golfplätzen vor. Für das holländische Weidegras *Lolium annuum* var. *Westerwoldicum* stellten sich mehrere *Pythium*-Arten als parasitär heraus.

Auch von den Samen dieser Gräser wurden verschiedene parasitäre Pilze isoliert. Zu den Infektionsversuchen wurden auch desinfizierte Samen verwandt. (Mit alkoholischer Sublimatlösung). In dieser Weise behandelte Samen keimten in sterilem Boden langsamer als unbehandelte Samen. Es stellte sich heraus, dass das Vorkommen bestimmter Pilze die Keimung beschleunigt. Temperatur und Feuchtigkeit des Bodens üben einen starken Einfluss auf die Infektion der Gräser mit *Rhizoctonia* spec. und *Sclerotium* spec. aus. Jedoch wurde die Bodensorte in Verbindung mit der Infektion noch nicht studiert.

Die einzelnen Infektionen in sterilem und nicht sterilem Boden werden ausführlich beschrieben.

LITERATUR

BARY, A. DE, Botanische Zeitung 39.
1881.

——————— and WORONIN, M., Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze.
1881, IV.

BUISMAN, CH. J., Root rots caused by *Phycomycetes.*
1927, Dissert. Utrecht.

BUNSCHOTEN, G., Invloed van de voeding op de virulentie van schimmels.
1933, Dissert. Utrecht.

BUTLER, E. J., An account of the genus *Pythium* and some *Chytridiaceae.*
1907, Mem. Dept. Agr. India. Bot. Ser. I, 5.

CONNECTICUT Agr. Exp. Stat., Rep. of the Director.
1929/30, Exp. St. Bull. 322.

DAHL, A. S., Snow mold on turf grasses.
1930, Phytopathology 20 : 131.
Effect of temperature on brown patch of turf.
1933, Phytop. 23 : 8.
Zonate eye spot on turf grasses.
1932, Phytop. 22 : 7.

DAVIS, W. H., Snow mold and brown patch caused by *Sclerotium rhizodes.*
1933, Phytop. 23 : 8.

DICKINSON, L. S., The effect of air temperature on the pathogenicity of *Rhizoctonia solani* parasitizing grasses on puttinggreen turf.
1933, Phytop. 23 : 8.

DORAN, W. L., Acetic acid and pyroligneous acid in comparison with formaldehyde as soil disinfectants.
1932, Journ. Agr. Res. 44 : 571.

DRECHSLER, CH., *Pythium* infection of cabbage heads.
1925, Phytopathology 15 : 482.

——————— *Pythium ultimum* and *Pythium debaryanum.*
1927, Phytop. 17 : 54.

——————— Zonate Eyespot of grasses caused by *Helminthosporium giganteum.*
1928, Journ. of Agr. Res. 37 : 473.

——————— Leaf spot and foot rot of Kentucky blue grass caused by *Helminthosporium vagans.*
1930, Journ. of Agr. Res. 40 : 447.

GODFREY, G. B., Experiments on the control of brown patch with chlorophenol mercury.
1925, Boyce Thompson Inst. Prof. Paper Nr. 1.

HESSE, R., *Pythium de Baryanum* ein endophytischer Schmarotzer.
1874, Diss. Halle.

HÖHNK, W., A new parasitic *Pythium.*
1932, Mycologia 24 : 489.

HUNGERFORD, C. W. and REMSBERG, R., *Sclerotium* diseases of grains and grasses.
1933, Phytop. 23 : 17.

JOHANN, F., Untersuchungen über *Mucorineen* des Waldbodens.
1932, Zentralbl. f. Bakt. II, 85 : 305.

KOBER, BR., Ueber die Physiologie und Morphologie von *Actinomyces oligocarbophilus* und dessen Bedeutung für den Ackerboden.
1929, Zentralbl. Bakt. II, 79 : 370.

MATTHEWS, V. D., Studies on the genus *Pythium.*
1931, Chapel Hill.

MEURS, A., Wortelrot veroorzaakt door schimmels uit de geslachten *Pythium* Pringsheim en *Aphanomyces* De Bary.
1928, Dissert. Utrecht.

MONTEITH Jr., J. A., Control of brown patch in turf.
1926, Phytop. 16 : 76.

——— A *Pythium* disease of turf.
1933, Phytop. 23 : 23.

——— and DAHL, A. S., Turf diseases and their control.
1932, The Bull. of the U.S. golf Ass. Vol. 12, Nr. 4.

——— and HARMON, T. C., Fungicidal control of brown patch of turf.
1927, Phytop. 17 : 50.

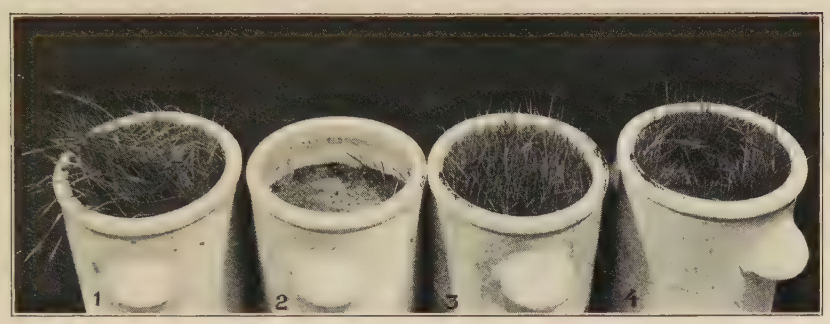
NIETHAMMER, A., Studien über die Pilzflora böhmischer Böden.
1933, Arch. f. Mikrobiol. 4 : 72.

OSMUN, A. V. and KROUT, W. S., A new *Sclerotium* disease of lawn grasses.
1918, Phytop. 8 : 72.

PAOLIS, C. DE, Esperienze sopra l'azione che i prodotti di secrezione e del ricambio di *Pythium* sp. hanno sulla germinazione del Grano.
1931, Boll. R. Stat. Pat. Veg. N. S. 9 : 138.

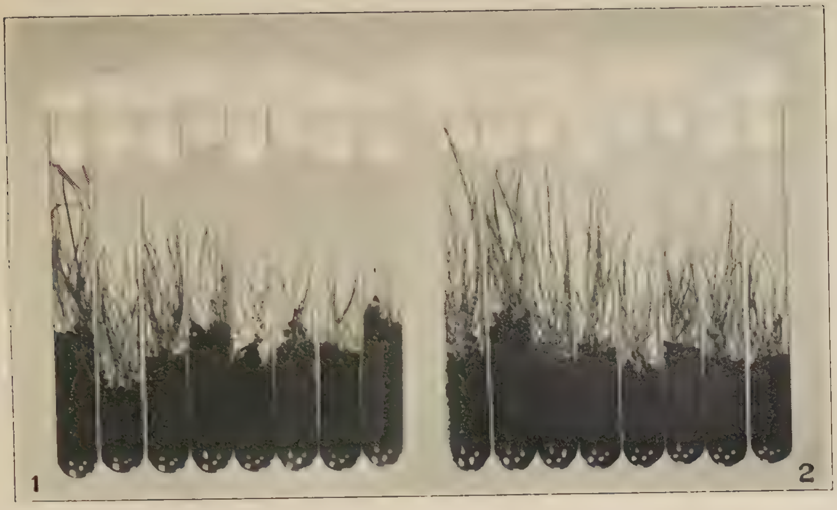
PIPER, C. V. and COE, H. S., *Rhizoctonia* in lawns and pastures.
1919, Phytop. 9 : 89.

SAMPSON, K., The occurence of snow mould on golf greens in Britain.
1931, The Journ. of the Board of Greenkeeping Res. 2 : 116.



AGROSTIS STOLONIFERA INFIZIERT MIT PYTHIUM VOLUTUM

1. Boden sterilisiert; nicht infiziert.
2. „ „ ; infiziert.
3. Boden nicht sterilisiert; nicht infiziert.
4. „ „ „ ; infiziert.



INFEKTION VON FESTUCA DURIUSCULA IN REINKULTUR.

1. Nicht infiziert.
2. Infiziert mit Pythium torulosum; Keimung und Wachstum gefördert.
3. Infiziert mit Rhizoctonia solani. Schädigung.
4. Infiziert mit Pythium spec. Schädigung.

PYTHIUM DE BARYANUM HESSE EM. DE BARY

VON

A. VAN LUIJK.

1. Morphologie der von Gräsern isolierten Stämme.

Von kranken Gräserwurzeln haben wir mehrfach einen Pilz isoliert, der mit *Pythium de Baryanum,* so wie er von de Bary und Butler beschrieben worden ist, übereinstimmt.

Der Pilz bildet in Reinkultur auf verschiedenen Agarböden sehr leicht Oogonien und Antheridien aus. Die kugeligen oder fast kugeligen glatten Oogonien werden terminal, lateral oder interkalar gebildet. An einem Oogonium sitzen 1 oder 2, seltener 3 Antheridien, die androgyn, diclyn seltener auch hypogyn angeordnet sind.

Besonders in jungen Kulturen befinden sich die Antheridien in unmittelbarer Nähe der Oogonien, häufig aber auch in kleineren oder grösseren Abständen. Die Oosporen die frei in den Oogonien liegen sind kugelig und dickwandig, die Oosporenwand schimmert stark blauviolett. Dies wird wohl nicht durch einen Farbstoff sondern durch Lichtinterferenz hervorgerufen. Es ist auffallend, dass diese Erscheinung, die bei verschiedenen Pythien vorkommt, bis jetzt in der Literatur noch nicht erwähnt worden ist. Diese Färbung die manchmal mehr bläulich; manchmal auch mehr rötlich erscheint, lässt sich wahrscheinlich als Unterscheidungsmerkmal zu systematischen Zwecken benutzen. Grösse der Oogonien: 15—27 μ, davon etwa 90% 19,5—24,5 μ. Mittelwert aus 100 Oogonien 22,3 μ.

Oosporen 12,8—21,1 μ, davon etwa 90% 15,5—20,8 μ.

Mittelwert aus 100 Oosporen 18,5 μ.

Oosporenwand: 0,89—2,5 μ, davon etwa 90% 1,19—2,09 μ. Mittelwert aus 100 Messungen 1,67 μ.

Konidien zahlreich.

Die Sporangien hatten einen Durchmesser von 20 bis 26 μ. Der Inhalt trat durch einen seitlichen Schlauch von 9,5 bis 11,5 μ. Länge in eine kugelige Blase von ± 27 μ. Durchmesser.

Die Blasen enthielten 10 bis 20 oder noch mehr Schwärmsporen, die in Bewegung ungefähr nierenförmig und im Ruhezustand kugelig mit einem Durchmesser von 8 bis 11 μ waren.

Schwärmsporen konnten mit der Methode nach Petri nicht hervorgerufen werden. Folgende Methode hatte aber Erfolg: Eine alte vertrocknete Reinkultur in Vitro von *Lolium annuum* die mit dem Pilz infiziert worden war, wurde reichlich mit sterilem Wasser übergossen. Nach einigen Tagen wurde das Pflänzchen aus der Röhre genommen und in frisches steriles Wasser gelegt. Dann bildeten sich zahlreiche Sporangien aus. Ein infiziertes Stück Blatt wurde auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckglas bedeckt. Der Objektträger wurde dann unter den Wasserleitunghahn gelegt, sodass jede Minute ein Tropfen neben das Deckglas auf den Objektträger fiel. So findet eine fortwährende Erneuerung des Wassers und des Sauerstoffs statt. Nach einer Nacht waren zahlreiche Schwärmsporen ausgebildet.

Nach dieser Methode wurden bei vielen Pythiumarten Schwärmsporen erhalten.

Butler hatte eine ähnliche Methode gebraucht, indem er sein Material unter den Tropfen eines Buretts brachte.

2. *Nomenklatur.*

Bis zu Drechslers Publikation im Jahre 1927, haben die Meinungen de Bary's und Butler's bezüglich der Artumgrenzung dieses Pilzes gegolten.

In einer kurzen Notiz hat dann aber Drechsler darauf hingewiesen, dass *P. de Baryanum* und *P. Butleri* oft verwechselt werden, und dass die am meisten vorkommende parasitische Form wohl als *Pythium ultimum* betrachtet werden muss. Das Hauptmerkmal von *P. ultimum* ist die Stellung der Antheridien in unmit-

telbarer Nähe des Oogoniums. Die Antheridien bei der von ihm als *P. de Baryanum* betrachteten Form werden nicht genau beschrieben. Er sagt nur „the relation between Oogonium and Antheridium approximates that represented in Hesse's figures" und weiter: „Cylindrical-stalk antheridia and pouch-like antheridia arising in immediately proximity to the oogonium are decidedly rare."

Die von Drechsler bisher veröffentlichten Angaben über die Unterscheidungsmerkmale zwischen *Pythium de Baryanum* und *P. ultimum* sind leider sehr unvollständig; die Abgrenzung zwischen den beiden Arten ist dadurch bisher ganz unsicher.

Pythium de Baryanum ist von Hesse ausführlich beschrieben worden; die Zeichnungen sind wohl der sehr regelmässigen Formen wegen als halbschematisch aufzufassen.

Angenommen, dass Hesse seinen Pilz genau beschrieben hat, und die Zeichnungen richtig sind (Type-material dieses Pilzes ist wohl nicht vorhanden) dann könnten unter *P. de Baryanum* nur die Formen eingeordnet werden, die in allen wichtigen Merkmalen mit seiner Beschreibung und mit seinen Zeichnungen übereinstimmen. Es sollen nach seiner Zeichnung Sporangien, Conidiën und Oogoniën rund 40 μ Durchmesser haben.

Wichtig ist dabei die Frage ob die sehr typische Form des Antheridiums genau gezeichnet und beschrieben worden ist. Hesse beschreibt einen „Befruchtungsfortsatz", der seitlich an der dem Oogonium zugewandten Seite des Antheridiums entsteht: in der Regel findet man aber, dass diese Bildung die schnabelförmig verlängerte Spitze des Antheridiums ist.

Eigentlich sollten, wenn diese Art im Sinne Hesse's aufgefasst werden muss, nur die Formen mit diesem seitlichen Befruchtungsansatz bei *P. de Baryanum* eingeordnet werden. Man darf dieses Merkmal bei der Beurteilung nicht ausser Acht lassen, und nur das Entspringen des Antheridiums aus dem basalen Teil als Kriterium verwenden. Hat Hesse das eine falsch wahrgenommen, dann kann man auch daran zweifeln, ob er das andere richtig beschrieben hat. Für die Stelle des Antheridiums gibt er noch eine andere Möglichkeit an; es könnte nämlich auch aus einem benachbarten Myzelzweig entspringen.

Dagegen darf man nicht annehmen, dass er eine andere An-

theridienform als die mit seitlichem Befruchtungsansatz wahrgenommen hat.

Soweit mir bekannt, sind Antheridien mit seitlichem Befruchtungsansatz niemals mehr beobachtet worden.

Dagegen kann man einen Pilz der der Beschreibung de Bary's entspricht, jeden Tag isolieren.

In de Bary's Veröffentlichungen werden die Unterschiede zwischen seinen Beschreibungen und Abbildungen und denen von Hesse kaum erwähnt. Er deutet nur an, dass Hesse mit einem Gemisch gearbeitet hat. Beim Durchlesen bekommt man den Eindruck, dass er die nötigen Verbesserungen an Hesse's Arbeit hat anbringen wollen, ohne jedoch seinen Schüler zu kritisieren.

Es besteht kein Grund ohne weiteres, anzunehmen, dass Hesse mit einem Pilz gearbeitet hat, den er richtig beschrieb und abbildete, und dass später de Bary eine Mischung in den Händen gehabt hat und durch die Beschreibung dieses Gemisches als verbesserte Diagnose die Arbeit dieses Forschers verpfuscht hat.

Manche *Pythium* Forscher sind aber dieser Ansicht. Soll jedoch die Nomenklatur der Pilze stabil bleiben, so darf man nur aus ganz sicheren Gründen die Arbeit eminenter Forscher wie de Bary angreifen. Wenn in einem Fall wie diesen entweder de Bary oder Hesse eine unrichtige Wahrnehmung gemacht hat, dann liegt es eher auf der Hand, dass es Hesse gewesen ist.

Nimmt man aus den oben auseinander gesetzten Gründen an, dass die Beschreibungen und Zeichnungen Hesse's unzuverlässig sind, so stehen zwei Wege auf. Einmal könnte man *Pythium de Baryanum* im Sinne de Bary und Butler's auffassen; es muss dann als *P. de Baryanum Hesse* em. de Bary bezeichnet werden. Oder man könnte die Art streichen, da sie falsch beschrieben worden ist und Typematerial sehr wahrscheinlich fehlt. Aus solchen Gründen müsste man aber die meisten alten Namen verschwinden lassen. Eine solche Massnahme sollte man aber nur im Notfalle ergreifen, um hoffnungslose Verwirrung zu verhüten.

Bis zur Publikation Drechsler's ist aber von einem Durcheinander nie die Rede gewesen, da bis dahin de Bary's Beschreibung immer als Basis genommen worden ist.

Drechsler hat seine Behauptungen betreffs *P. de Baryanum* und *P. ultimum* niemals genügend begründet.

Pythium ultimum ist von Trow (1901) hauptsächlich aus folgenden drei Gründen von *de Baryanum* unterschieden: saprophytische Lebensweise; Bildung der Antheridien stets in unmittelbarer Nähe der Oogonien; Fehlen der Schwärmsporen.

Pythium de Baryanum in dem Sinne Butlers und de Barys ist hauptsächlich ein Parasit für Keimpflanzen; ausser Antheridien die in unmittelbarer Nähe des Oogoniums androgyn gebildet werden, entstehen sie wohl auch in kleinerer und grösserer Entfernung des Oogons; auch hypogyne und diclyne Antheridien kommen häufig vor; Schwärmsporen kommen bei *de Baryanum* vor, sind aber schwierig zu erhalten.

Es ist zweifelhaft ob die genannten Unterschiede genügen, die Aufstellung von Arten zu rechtfertigen. Es ist vielmehr wahrscheinlich, dass *Pythium de Baryanum* wie viele sehr verbreitete Pilzarten nicht eine genetische Einheit darstellt.

Von der Fassung des Speziesbegriffs wird es abhängen, wie viele und welche von den genetischen Einheiten man zu einer Art zusammenfasst. Aus praktischen Grunden ist es sicher zu empfehlen, die Arten nicht zu eng zu begrenzen. Als gutes Beispiel einer richtigen Artumgrenzung kann man *Puccinia graminis* betrachten. Die Art ist auf diese Weise von jedem Phytopathologen und Mycologen leicht bestimmbar; für die Bestimmung der Formen innerhalb dieser Art sind ausführliche, mehr spezialisierte Arbeiten notwendig.

Es scheint uns, dass Parasitismus und positive oder negative Schwärmsporenbildung nicht als Merkmal zur Artunderscheidung in Betracht kommen.

Auch ist es wohl zweifelhaft, ob die Unterschiede zwischen den Antheridien von *P. de Baryanum* und *ultimum* genügen, um diese beiden Pilze spezifisch zu unterscheiden, da doch die Antheridien bei *P. de Baryanum* äusserst variabel sind.

Müssen die beiden Pilze als eine Art betrachtet werden, so kann diese jedoch noch nicht als *P. ultimum* bezeichnet werden. Wenn der Hessische Pilz nicht wieder gefunden wird, so muss der de Barysche als *P. de Baryanum* Hesse, em. de Bary aufgefasst werden. Wird dagegen ein Pilz gefunden, der genügend mit der Diag-

nose und den Abbildungen von Hesse übereinstimmt, so muss der de Barysche Pilz mit dem ältesten Synonym bezeichnet werden.

De Bary und Butler nennen in diesem Zusammenhange *P. equiseti* Sadebeck und *Lucidium pythioides* Lohde, beide in dem selben Jahre als *P. de Baryanum* Hesse beschrieben.

DIE SYMPTOME DES BORMANGELS BEI ZEA MAYS

VON

J. VAN OVERBEEK.

Zur Zeit von Sachs' (1865) wusste man nur, dass es Pflanzen gab, welche Bor enthalten, z.B. *Fucus* und *Zostera*. Später konnte man in vielen Pflanzen Bor nachweisen, aber von einem Borbedürfnis der Pflanzen war noch nichts bekannt.

Heute können wir es als bewiesen betrachten, dass die meisten Pflanzen eine, wenn auch oft nur sehr geringe Menge Bor brauchen, um normal wachsen zu können. Vor allem sind es Warington und Brenchley gewesen, die in einer Serie von Untersuchungen (Brenchley & Thornton, 1925; Br. & Warington, 1927: Warington, 1923, 1926, 1933) den Einfluss von Bor auf verschiedene Pflanzen studiert haben. Auch bei *Mais* haben sie versucht, ob man an den Pflanzen Symptome von Bormangel feststellen könnte (Br. & W., 1927). Sie hatten hierbei aber keinen Erfolg, wahrscheinlich weil sie die Versuche während des Winters angestellt hatten. Auch die neuerdings von Warington (1933) veröffentlichen Untersuchungen sprechen dafür. Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Tageslänge von grosser Bedeutung für das Zutagetreten der Bormangelsymptome ist.

In vorliegenden Versuchen habe ich mir die Frage vorgelegt, ob es nicht möglich sei bei Mais, unter günstigeren Bedingungen ein bestimmtes Krankheitsbild als Folge von Bormangel zu erhalten.

Methode.

Um unter möglichst günstigen Bedingungen zu arbeiten, wurden

die Versuche im Sommer, während der Monate Mai, Juni und Juli 1931 ausgeführt.

Die Samen von „Virginianer Pferdezahn Mais" wurden während 20 Minuten mit einer Uspulunlösung (0.25%) desinfiziert. Darauf wurden sie einige Stunden gewässert, und schliesslich in sterilisiertem weissen Sand gesät. Nachdem die Pflanzen einige Zentimeter aus dem Boden hinausragten, wurde eine Anzahl möglichst gleicher Pflanzen zusammen gesucht und in grosse Marmeladengläser, welche mit einer Nährlösung gefüllt waren, verpflanzt.

Die Töpfe waren von Glas, innen sorgfältig paraffiniert und aussen erst schwarz später darüber noch weiss angestrichen. Diese Kulturgefässe hatten einen durchbohrten Deckel, durch den eine Pflanze gesteckt werden konnte.

Als Nährlösung wurde eine Van der Cronesche Lösung verwendet, wozu immer 0.5 mg $MnSO_4$ im Liter beigegeben wurde. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist also:

1.00 g KNO_3; 0.50 g $MgSO_4$; 0.50 g $CaSO_4$; 0.25 g $Ca_3(PO_4)_2$; 0.25 g $Fe_3(PO_4)_2$; 0.005 g $MnSO_4$.

Zu dieser Grundlösung wurde nun überdies eine bestimmte Menge H_3BO_3 hinzugefügt. Das von den Pflanzen verdünstete Wasser wurde jede Woche 3 mal durch destilliertes Wasser ergänzt; alle 2½ Wochen wurden die Lösungen ganz erneuert.

Auch wurde das pH der Lösungen bestimmt, am Anfang der Versuche sogar 3 mal jede Woche, aber da sich hierbei keine Bezonderheiten zeigten, wurden die pH-Bestimmungen auf 2 in 2½ Wochen beschränkt. Das pH einer frischen Lösung war immer 7.0, das einer 2½ Wochen alten Lösung etwa 7.5.

Versuche.

Die Versuche wurden in einem Gewächshaus ausgeführt, wo die Temperatur ziemlich stark wechselte und am Tage meistens über 20° C. war, Am 12. Mai wurden die Samen ausgesät und am 20. Mai wurden die jungen Pflanzen in die Kulturgefässe verpflanzt. Diese Kulturgefässe enthielten die Grundlösungen, wozu ein Zusatz von: 0.0; 0.1; 1.0; 5.0; 10.0; und 50.0 mg H_3BO_3 im Liter hinzugefügt war. Der Versuch war also in 6 Serien eingeteilt. Jede Serie enthielt 5 Kulturgefässe.

Am 20. Mai waren die Pflanzen 6 cm lang. Während der ersten Wochen nach dem Verpflanzen wuchsen die Pflanzen der Serie mit 0.1 mg, am besten, dann folgten die Pflanzen mit 1.0 mg und darauf die Pflanzen, die keinen Borzusatz erhalten hatten. Die Pflanzen mit Borzusätzen von 5, 10 und 50 mg wuchsen erheblich langsamer als die erstgenannten. Während der ersten Wochen sahen die Blätter aller Serien ähnlich aus; die Blätter der Serie mit 50.0 mg waren nur etwas gelblich.

Etwa 4 Wochen nach dem Verpflanzen zeigten sich auf den neugebildeten Blättern der 0.0 mg-serie *längliche, weisse, durchscheinende Streifen*. Schliesslich unterschieden sich alle neugebildeten Blätter dieser Serie sehr stark von denen aller übrigen Serien, die Borzusatz erhalten hatten, da sie allein die typische Streifung zeigten.

Am 24. Juni wurde nun zu den Lösungen der 0.0 mg-Serie, welche also noch kein Bor enthielten, ein Borzusatz von 1 mg H_3BO_3 im Liter zugegeben. Schon in der ersten Woche vom Juli hatten alle Pflanzen dieser Serie neue Blätter gebildet, welche nur noch an ihren apikalen Teilen die weisse, transparente Streifung aufwiesen, während die basalen Teile ganz normal waren. Am 8. Juli hatten diese Pflanzen schon ganz normale Blätter gebildet. Alle älteren Blätter behielten aber die Streifen, welche später durch Austrocknen eine braune Farbe bekamen.

Die Pflanzen der 5 mg, 10 mg und 50 mg-Serien hatten Anfang Juli begonnen viel besser zu wachsen, und deshalb war der Unterschied zwischen den verschiedenen Serien auch kleiner geworden. Hieraus geht also klar hervor, dass *Mais-Pflanzen späteren Alters viel grössere Bormengen vertragen können als während ihrer Jugend*. Dies ist auch von verschiedenen anderen Autoren bei anderen Pflanzen beobachtet worden (M e s, 1930; s'J a c o b, 1927).

Es hat sich aber ausserdem gezeigt, dass ältere Pflanzen nicht nur grössere Bormengen vertragen können, sondern dass sie auch ein grösseres Borbedürfnis haben. Dies geht aus der folgenden Tatsache hervor. Wie schon oben erörtert wurde, wiesen die Pflanzen der Serie mit 0.1 mg im Anfang der Versuche das beste Wachstum auf. Als jedoch die Pflanzen älter wurden, verschwand dieses optimale Wachstum der Pflanzen mit 0.1 mg mehr und mehr, bis sie im Juli sogar von den Pflanzen mit 1.0 mg übertroffen wurden.

Ueberdies zeigten sich in der Serie mit 0.1 mg auch Pflanzen mit den typischen weissen, transparenten Streifen, welche wir als ein Symptom von Bormangel kennen gelernt haben. Hieraus geht also hervor, dass *die Bormenge, welche Mais nötig hat, um ein optimales Wachstum aufzuweisen, mit dem Alter grösser wird.*

Eins der Symptome von Bormangel bei *Vicia Faba* ist das stark erkrankte und reduzierte Wurzelsystem. Dies ist aber bei *Mais* keineswegs der Fall. Nur eine etwas geringere Entwicklung des Wurzelsystems ist zu beobachten.

Ferner wurde Mais in mit Nährlösung durchtränkten Sand gezogen, aber Erscheinungen von Bormangel konnten nicht beobachtet werden.

Zusammenfassung.

Wird *Zea Mais* in Nährlösungen ohne Bor gezogen, so zeigen sich nach etwa einem Monat auf den neugebildeten Blättern längliche, weisse, transparente Streifen. Setzt man die bormangelkranken Pflanzen in eine borhaltige Lösung, so bilden die Pflanzen anfangs noch Blätter mit gestreiften Spitzen, später aber wieder ganz normale Blätter.

Pflanzen mit einem Borzusatz van 0.1 mg im Liter weisen in den ersten 4 bis 5 Wochen ihrer Wachstumsperiode ein optimales Wachstum auf. Später bei etwa 2 bis 3 Monate alten Pflanzen zeigen die Pflanzen der Serie mit 0.1 mg deutliche Symptome von Bormangel. Das optimale Wachstum findet in dieser Periode bei einem Borzusatz von 1.0 mg Borsäure im Liter statt. Das Borbedürfnis nimmt also mit dem Wachstum der Pflanzen zu.

LITERATUR

BRENCHLEY & THORNTON, The Relation in the Development etc.
1925, Proc. of the Roy. Soc. 98.

——— & WARINGTON, The Role of Boron in the Growth of Plants.
1927, Ann. Bot. 41.

s'JACOB, Anorganische Beschadigingen bij Pisum sativum L. en Phaseolus vulgaris L.
1927, Dissertatie, Baarn (holl.).

MES, Fisiologiese Siektesimptome van Tabak.
1930, Dissertatie, Baarn (holl.).

WARINGTON, Effect of Boric Acid and Borax.
1923, Ann. Bot. 37.

——— Changes induced in the anat. Structure of Vicia Faba by Absence of Boron.
1926, Ann. Bot. 40.

——— The Influence of the Length of Day on the Response of Plants to Boron.
1933, Ann. Bot. 47.

THE AREA OF DISTRIBUTION OF THE CERATOSTOMELLA (GRAPHIUM) ELM DISEASE

BY

CHRISTINE J. BUISMAN

In recent phytopathological literature one cannot find a survey of the territory, invaded by Graphium ulmi up to the present time. So Professor Westerdijk asked me to state, where the Graphium elm disease was located up to the spring of 1934.

It proved impossible to make this survey as complete as one would like, since in the first years after the discovery of the disease people did not always realize its importance and therefore did not trouble to follow up its spread exactly. There have been also various reports about the presence of Graphium ulmi in a certain locality which proved to be erroneous afterwards. With the aid of many papers on this question and of the experience, gained at the Baarn laboratory, I tried, however, to outline the spread of the elm disease as exactly as possible. [1]

Holland. In Holland the spread of the disease was followed up by Spierenburg (40). For the first time material of diseased elm trees was received by the Dutch Phytopathological Service in 1919. In 1920 the disease occurred in various localities already. When twigs of the diseased trees were examined the annual rings of 1918, 1919 and 1920 showed as a rule the well-known brown streaks in the wood. In some cases there was a slight suspicion that also the annual ring of 1917 might have been infected. Spierenburg's second paper (41) contains a map of Holland, indicating

[1] The list of publications includes only those papers that contain important information regarding the spread of the disease.

the places where the disease was present in 1921. From this map it is evident that in 1921 the elm disease could be found in every province of Holland. Nevertheless the disease varied in intensity in various localities. Later on it became very clear that the disease was much worse in the southern and eastern parts of the country than in the northern and western. The northern part of the province North-Holland and the provinces Groningen and Friesland remained practically free from the disease for several years. Only recently the disease attacked the elms in Groningen and Friesland to a considerable degree. In 1933 the disease was located on all the Dutch North Sea islands, with the exception of Vlieland (Buisman, 5).

Belgium. Spierenburg also draws attention to the occurrence of the disease in Belgium. She was informed that the disease was present in a large part of that country in 1921. A notice in the Ann. Trav. Publics de Belgique (1925, 3) points to the fact that many elms have died because of the disease since 1918—1919. Marchal and Verplancke (21) mention the presence of Graphium ulmi between 1919 and 1925. Gallot (13) states in 1928 that the disease had invaded parts of Hainault, where in 1925—1926 no diseased elms had been found.

France. Some of the first reports concerning the elm disease came from France. The dying-off of elm trees, described by Guyot from Picardie in 1918 (17), has doubtless been caused by Graphium ulmi, as pointed out by Westenberg (44). Marchal and Foex (22) noticed in 1919 many diseased elms in the region of the Marne and part of the Meuse. Foex informed Spierenburg in 1921, that the disease had been reported to him in 1919 from Champagne and Argonne, and since in various regions, all situated north of the Seine valley. In 1924, however, v. Poeteren (35) reported the presence of the disease in Versailles. According to Marchal and Foex (23, 24, 25) the disease occurred in 1925 in Picardie, the neighbourhood of Paris, the south-western part of France and probably in other localities, in 1926—1927 in a large part of France, the S. W. included, and in 1928 in the larger part of France. The intensity of the disease.

however, varied in the affected regions. Guinier (1930, 16) mentioned the presence of the disease a.o. in Lorraine (which province had been invaded then only 5—6 years ago), the region of the Canal du Midi and Arles, Westenberg (1931, 43) in Auvergne.

Germany. According to a very recent publication of v. Tubeuf (1934, 42a) his 1920 paper (42), where he describes a dying-off of elm twigs, is frequently quoted among the elm disease literature. This might create the impression that the elm disease was present in Germany as early as 1920, and that v. Tubeuf, who attributed the dying-off he observed to abundant blossoming, did not diagnose it correctly. He therefore stresses the fact that the symptoms he described have nothing to do with the Graphium elm disease. Whether the dying-off of elm twigs, mentioned by Pape in 1920 (30) and thought by him to be identical with the disease, described by v. Tubeuf, is the first record of the Graphium disease in Germany, remains uncertain. In his subsequent publications (31, 32) Pape states that the first dying-off of elm trees on a larger scale was reported from Bonn in 1921. In the following years, especially in 1924, the disease did much damage in Westfalen and Rheinland. In Nürnberg the disease has been noticed since 1922, in Bremen since 1923. Possibly it was present in Potsdam near Berlin in 1924. One of Pape's papers (32) brings a map registrating the distribution of the disease in Holland and Germany in 1924. From this map it is apparent that the Biologische Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, had not been notified up to 1924 of the presence of the disease in Nürnberg and Potsdam. Pape himself who did not see the trees under discussion is not quite sure whether the disease in Potsdam in 1924 has been identical with that in western Germany.

Wollenweber and Stapp (48) present many valuable and absolutely reliable data regarding the status of the disease in Germany in 1929. With certainty the disease could be located then a.o. in the following German cities: Köln, Aachen, Hamburg, Hannover, Bremen, Münster i.W., Oldenburg, Dresden, Nürnberg, Berlin, Breslau, Durlach (Baden). There was no evidence

of the occurrence of Graphium ulmi in Königsberg (E. Prussia) and in E. Frisia. The absence of the disease in E. Frisia is not amazing, since the adjoining regions in Holland for several years did not show the disease to a considerable degree.

England. In England, too, the disease has made its appearance. In 1927 Wilson and Wilson (47) stated the presence of Graphium ulmi in the neighbourhood of London. In their opinion it is very probable that the disease was present in 1926 already, since in that year many diseased elms in the vicinity had been removed. It was, however, no longer possible to state with certainty whether these trees had been attacked by Graphium ulmi. Since 1927 the disease spread rapidly in England. The publications of the Forestry Commission (11, 12) and Peace (33) give a very good idea of this spread. In 1928 the disease was common in the southern and eastern parts of England, while in the Midlands many cases could be noticed. According to Grove (15) the number of affected counties was 33 in 1931. In Peace's paper and also in the 1932 publication of the Forestry Commission a map is given, indicating the spread and the intensity of the disease in the various English counties.

Up to now the disease has not been noticed in Scotland, though Wilson and Wilson have watched the elms carefully for any symptom of disease. We may be sure, therefore, that the disease is not present in Scotland.

Austria. In Austria the disease was discovered in 1926 (Schimitschek, 38). Wollenweber and Stapp confirmed the presence of Graphium ulmi in Vienna. In 1931 (Fischer, 10) many elms in Vienna had succombed to the attack of the fungus.

Poland. Sallmann (1928, 36), writing from Kattowitz in Poland, mentions the occurrence of the disease in various industrial towns. This is the only report from Poland regarding this question we could find.

Czecho-Slovakia. In Czecho-Slovakia a paper on the elm

disease was written by Zabka (49). This paper, written in Czech, was not available to me. Dr. Picbauer from Brno, however, has been kind enough to send me a German summary, from which it is apparent that the disease has been observed in Czecho-Slovakia since 1928—1929. According to Dr. Picbauer the disease is prevalent in the valleys of the larger Slovakian rivers, whereas it is rare in the mountains.

Switzerland. Grossmann (1932, 14) reported the disease from Switzerland. Lendner (18) stated in 1932 that the disease had been present then in Geneva for several years. Prof. Westerdijk and I noticed it there in 1929.

Italy. In Italy the disease has been recorded by Sibilia (39) in 1930 from the region near Modena. There seem, though, to have been some cases in the province Emilia the year before (Draghetti, 8). Graphium ulmi spread with rapidity in Italy. Corneli (7) mentions its occurrence in Umbria in 1930. According to Petri (34) in 1931 the disease was present not only in Emilia and a part of Toscana, but also in the Marches and in Umbria. During a visit to Italy in the spring of 1933 I stated that the disease was very common in Emilia, and I could confirm the presence of Graphium ulmi in Umbria, too.

In Italy the problem of the Graphium elm disease is very important, since in that country the elm is largely used as a support for the vine.

Roumania. Savulescu (37) discovered the disease in Roumania in 1929. Alexandri (1) reports in 1932 that by then the disease had spread over the whole country.

Bulgaria. Atanasoff and Martinoff (2) stated the presence of the disease in Bulgaria. Their paper has been written in 1932—1933, and the disease had been there then for a few years. In 1933 the disease was generally found in Sofia and the region south and west of that city, extending to the frontier of Yougo-Slavia. In two places in the central part of northern Bulgaria the disease was observed, too. Atanasoff and Marti-

noff are of the opinion that the disease reached Bulgaria through Yougo-Slavia, as the first author saw many diseased elm trees along the railroad from Tzaribrod to Belgrado.

Portugal. In the winter of 1933—1934 Dr. Loureiro Ferreira, of the Institute for Plant Pathology Verissimo de Almeida, Lisbon, isolated Graphium ulmi from the wood of diseased elm trees in Lisbon. During a visit to Portugal I saw Dr. Loureiro Ferreira's cultures and the infected wood, and I could confirm the presence of Graphium ulmi in Portugal.

United States of North America. Not only in Europe, but also in the United States the disease may be found at the present time. The first cases were registered in Ohio in 1930 (May, 27, 28). Since I happened to be in the States then, some twigs of one of these diseased trees were sent to me. I isolated Graphium ulmi from them and immediately notified the Office of Forest Pathology in Washington, D.C., as the presence of Graphium ulmi in the States was not known at the time. In the meantime Mr. May, from the Agric. Expt. Station in Wooster, Ohio, had also isolated Graphium ulmi. Altogether four or five cases were found in Ohio in 1930, and four more in 1931 (May, 29, Liming, 20). Some of the diseased trees showed a discoloration of the wood in the annual ring of 1929, and one of the 1930 cases even in the ring of 1928. In 1932 no new cases were discovered in the States, but in 1933 a severe outbreak of the disease occurred in the neighbourhood of New York, in New Yersey and New York State (Felt, 9, Clinton, 6, and according to information by letter from May and Liming). Several hundreds of diseased trees were spotted in this region. One infected tree was discovered in Baltimore, Maryland. Clinton (6) reports two cases in Connecticut up to February 1934. In one of these two trees the annual ring of 1931 showed the brown discoloration of the wood. In Ohio one more case was found in 1933.

Countries, where the disease has not been stated up to the present time.

Scandinavia. Wilson (46) mentions a rumour from Norway in 1926 that the Graphium disease should have invaded that country. Wollenweber and Stapp, however, examined various twigs from „suspected" elms in Norway, and these twigs did not show the characteristic discoloration of the wood. In the following years the occurrence of the disease in Norway has not been confirmed, and we must take it for granted that the disease is not present in that country. Neither has the disease been noticed in Sweden or Denmark, though the Danish Phytopathological Service watches the elm trees carefully. From twigs of a diseased elm in Denmark, that were forwarded to our Laboratory some years ago, I could not isolate Graphium ulmi, but only Verticillium alboatrum (45).

Scotland. I mentioned already the fact that the disease does not occur in Scotland.

Estonia. Lepik (19) lays stress on the absence of Graphium ulmi in Estonia in 1932.

Spain. Martinez (26) described in 1932 an elm tree, showing the symptoms of the Graphium disease in the neighbourhood of Madrid. Some twigs of this tree were sent to our laboratory, but it proved impossible to grow Graphium ulmi from them. They showed, moreover, a discoloration in the wood which was not identical with the discoloration, caused by Graphium ulmi. During a trip to Madrid in the spring of 1934 I visited with Prof. Westerdijk and Dr. Sardina the place, where the tree under discussion had grown. Though many elms stood in the vicinity, we could not find a single case of the Graphium disease. As yet, therefore, we cannot add Spain to the list of the countries were Graphium ulmi is present.

SUMMARY.

Up to March 1934 the Graphium disease has been stated to occur in the following countries: Holland, Belgium, France, Germany, England, Austria, Czecho-Slovakia, Switzerland, Italy, Roumania, Bulgaria, Portugal and the United States. The only report from Poland has not been confirmed, and that from Yougo- Slavia is as yet incomplete.

The disease has not been stated in Scandinavia, Denmark, Estonia, Scotland and Spain.

With regard to the occurrence of the disease in Ireland, Hungary, Lituania, Latvia, Russia and Greece I could not find any reference.

Note.

U. S. of America. Since this paper went to press, we received some more data regarding the spread of the disease in the United States. In his publication: „Outbreaks of the Dutch Elm Disease in the United States" (Circular 322, U.S. Department of Agriculture, Washington D.C., August 1934), May mentions the fact that by then more than 3800 cases of the Graphium disease had been stated in New Jersey and New York, and 23 in Connecticut.

Hungary. Through the courtesy of Dr. Béla Husz and of the Director of the Institute for Viticulture in Budapest Professor Westerdijk received some twigs of elm trees, growing in Hungary and apparently attacked by the elm disease. It was an easy matter to isolate Graphium ulmi from these twigs.

Yougo-Slavia. Prof. Vladimir Skoric, Zagreb, states in a letter that he noticed the disease in 1928 in Yougo-Slavia, but that it became more frequent only in the last four years. Both the elm trees in cities and villages and those in the woods along the river Sava have been attacked. Prof. Skoric isolated Graphium ulmi from elms in various parts of the country.

We must, therefore, include both Hungary and Yougo-Slavia among the countries where the elm disease is present.

CITED LITERATURE.

1. ALEXANDRI, A. V., Uscarea ulmilor in România.
   1932, Bulet. Soc. studentilor in Stiinte naturale, III, pp. 1—16.
2. ATANASOFF, D. and MARTINOFF, ST., Ceratostomella ulmi (Schwarz) Buisman — Graphium ulmi Schwarz.
   1932—1933, Yearbook of the Univ. of Sofia, Faculty of Agric. XI, pp. 71—86.

*3. ANONYMUS, La maladie des ormes.
   1925, Ann. Trav. Publ. de Belgique, Ser. 2, LXXVIII, pp. 121—124.
   1925, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. IV, p. 383.

4. BARTLETT RESEARCH LABORATORIES, The European Elm Disease.
   1928, Bull. 1, pp. 1—35. See Wilson.
5. BUISMAN, CHRISTINE, Verslag van de onderzoekingen over de iepenziekte, enz. gedurende 1933.
   1934, Tijdschrift over Plantenziekten XL, pp. 65—87.
6. CLINTON, C. P., Diseases and Injuries. Plant Pest Handbook for Connecticut.
   Conn. Agric. Exp. St. Bull. 358, p. 198 and pp. 305—306.

*7. CORNELI, E., Moria degli olmi prodotta da Graphium ulmi Schwarz.
   1933, Riv. Pat. Veg. XXIII, pp. 27—31.
   1933, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. XII, p. 541.

*8. DRAGHETTI, A., Il decorso della malattia degli olmi nel Modenese.
   1932, Ann. R. St. Sper. Agrar. di Modena. II, pp. 300—304.
   1932, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. XI, p. 810.

9. FELT, E. P., The Dutch Elm Disease (Graphium ulmi) and Its Control.
   1933, Bartlett Research Laboratories, Educational Bulletin 60, pp. 1—23.

*10. FISCHER, R., Das Ulmensterben.
   1931, Die Natur, Vienna, p. 61.
   1932, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. XI, p. 755.

11. FORESTRY COMMISSION., The Dutch Elm Disease.
   1928, Leaflet 19, pp. 1— 6. Revised September, 1933.
12. ——————— Elm Disease: The Present Position.
   1932, Scott. For. Journ. XLVI, pp. 194—196.
13. GALLOT, Note relative à la maladie des ormes.
   1928, Bull. Soc. Centr. Forest., Belgique, XXXI, pp. 206—207.

14. GROSSMANN, HELEN, Das Ulmensterben.
1932, Schweiz. Zeitschr. für Forstwesen LXXXIII, pp. 50—59.

*15. GROVE, A., The Elm Disease.
1931, Gard. Chron. XC, p. 396.
1932, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. XI, p. 336.

16. GUINIER, PH., La maladie des ormes en France.
1930, Rev. de Path. vég. et d'Ent. agric. XVII, pp. 377—379.

17. GUYOT, M., Notes de Pathologie végétale.
1921, Bull. de la Soc. de Path. vég. VIII, pp. 132—136.

18. LENDNER, A., La maladie des ormeaux.
1932, Revue Horticole Suisse, XI, pp. 1—7.

19. LEPIK, E., Einige forstliche Pflanzenschutz-Fragen in Estland.
1932, Mitt. der Phyt. Versuchsstation der Univ. Tartu in Estland XII, pp. 3—12.

20. LIMING, O. N., Present Status of the Dutch Elm Disease.
1932, Phytopathology XXII, p. 17.

21. MARCHAL, E. et VERPLANCKE, G., Champignons parasites nouveaux pour la flore belge observés de 1919 à 1925.
1926, Bull. Soc. Roy. Bot. Belg. LIX, pp. 19—25.

22. MARCHAL, P. et FOEX, M. E., Rapport phytopath. pour les années 1919—1920.
1921, Ann. des Epiphyties VII, p. XLIX.

23. ——————— Rapport phytopath. pour l'année 1925.
1925, Ann. des Epiphyties XI, p. 465.

24. ——————— Rapport phytopath. pour les années 1926—1927.
1927, Ann des Epiphyties XIII, p. 451.

25. ——————— Rapport phytopath. pour l'année 1928.
1928, Ann. des Epiphyties XIV, p. 467.

26. MARTINEZ, J. B., La Grafiosis del Olmo.
1932, Montes e Industrias XIX, pp. 499—503.

27. MAY, C., Dutch Elm Disease in Ohio.
1930, Science LXXII, pp. 142—143.

28. ——————— The Dutch Elm Disease.
1930, Proc. Sixth National Shade Tree Conference, pp. 91—94.

29. ——————— Recent Study of the Dutch Elm Disease.
1931, Proc. Seventh National Shade Tree Conference, pp. 88—92.

30. PAPE, H., Krankheiten und Beschädigungen der Kulturpflanzen im Jahre 1920.
1922, Mitt. aus der Biol. Reichsanst. für Land- und Forstwirtsch. XXIII, p. 98.

31. ——————— Ein Massensterben von Ulmen in Deutschland.
1924, Nachrichtenblatt für den deutschen Pflanzenschutzdienst, IV, pp. 84—85.

32. PAPE, H., Das Ulmensterben in Deutschland.
1924, Mitt. Deutsch. Dendr. Gesellsch. pp. 284—288.

33. PEACE, T. R., The Dutch Elm Disease.
1932, Forestry VI, pp. 125—142.

34. PETRI, L., Rassegna dei casi fitopatologici osservati nel 1931.
1932, Boll. R. Staz. Pat. Veg. XII, p. 43.

35. v. POETEREN, N., Verslag over de werkzaamheden van den Plantenziektenkundigen Dienst in het jaar 1924. De iepenziekte.
1925, Versl. en Med. Plantenz. Dienst Wageningen, 41, pp. 48—50.

*36. SALLMANN. Das grosse Ulmensterben.
1928, Gartenwelt XXXII, pp. 49—50.
1928, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. VII, p. 352.

*37. SAVULECU, T., L'état phytosanitaire en Roumanie durant l'année 1929—1930.
1931, Ann. Inst. Recherches Agron. de Roumanie. III, pp. 240—256.
1932, Abstr. in Rev. of Appl. Myc. XI, p. 156.

*38. SCHIMITSCHEK, E., Ulmensterben in Oesterreich.
1927, Wiener Allg. Forst- und Jagdzeitung, XLV, p. 279.

39. SIBILIA, C., La moria degli olmi in Italia.
1930, Boll. R. Staz. Pat. Veg. X, pp. 281—283 and pp. 311—325.

40. SPIERENBURG, D., Een onbekende ziekte in de iepen I.
1921, Versl. en Meded. van den Plantenz. Dienst Wageningen, 18, pp. 3—10.

41. ——————— Een onbekende ziekte in de iepen II.
1922, Versl. en Meded. van den Plantenz. Dienst Wageningen, 24, pp. 1—31.

42. v. TUBEUF, C., Absterben der Ulmenäste im Sommer 1920.
1920, Naturw. Zeitsch. für Land- und Forstwirtsch. XVIII, pp. 228—230.

42a. ——————— Absterben von Ulmenästen.
1934, Zeitschr. für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, XLIV, 8, pp. 423—430.

43. WESTENBERG, J., La maladie de l'orme en Auvergne.
1931, Rev. de Path. vég. et d'Ent. agric. XVIII, pp. 24—28.

44. ——————— Uit de historie van de Graphium-ziekte in de iepen.
1932, Tijdschrift over Plantenziekten XXXVIII, pp. 61—66.

45. WESTERDIJK, J. en BUISMAN, C., De Iepenziekte.
1929, Ned. Heide-Maatschappij, p. 43.

46. WILSON, M., The Dutch Elm Disease.
1927, Gard. Chronicle LXXXI, pp. 133— 134.
1928, Reprinted in Bartlett Research Laboratories, Bull. 1, pp. 32—33.

47. WILSON, M. and WILSON M. J. F. The Occurrence of the Dutch Elm Disease in England.
1928, Gard. Chronicle LXXXIII, pp. 31—32.

48. WOLLENWEBER, H. W. and STAPP, C., Untersuchungen über die als Ulmensterben bekannte Baumkrankheit.
1929, Arb. aus der Biol. Reichsanst. für Land- und Forstwirtschaft, XVI, pp. 283—324.

*49. ZABKA, J., Grafioso jilmu a volba náhradni dřeviny. (Les dégats du Graphium ulmi sur les ormes et le choix des essences supplémentaires.)
1933, Lesnická Práce, XII, pp. 541—545.

Papers, marked with an asterisk, were not seen by the author.

GROWTH OF ACTINOMYCES MACULATUS (MILLARD) IN VARIOUS SOLUTIONS

BY

J. B. THOMAS.

§ 1. *Introduction.*

Though various investigators have worked already on the physiology of nutrition of Actinomycetes, they have up till now not restricted themselves to find out how one species reacts on different changes of the medium.

Waksman and his collaborators made a study of the appearance of the cultures as regards colour, form of the colonies and whether or not aerial mycelium occurs; as regards the microscopical characters in various solutions, they describe the frequention of spirals and the form of the conidia. As to the influence of certain compounds, they estimate these at the rate of growth of the fungus.

Lieske too investigated many species, but treats the physiological characters of the Actinomycetes in general.

Krainsky worked more specially on the connection between colour and substrate.

Duché points out that the Actinomycetes do not possess very labile characters as has been so far accepted, but that every species, provided they are cultivated quite purely and under perfectly equal and constant circumstances, always show the same characters.

As far as I know the above mentioned investigators never used dry-weight as a measure for the influence of certain culture media.

So it seemed important to me to compare the results of the growth of the fungus in various media, to study the changes in the pH. and the dryweight, to note the morphology in these synthetic media, all this with one special species. For this purpose I obtained Actinomycetes maculatus from the Centraal Bureau voor Schimmelcultures at Baarn, a species described by Millard in his studies on potato-scab.

Millard cultivated various Actinomycetes, isolated from potatoes and pointed out, that these cannot as before be said to belong to one species Actinomyces scabies.

One of these species he describes as Actinomyces maculatus n. sp. For cultivation Millard used 19 different media, liquid as well as solid and described how the fungi grew on these. The media however were quite different and not meant for mutual comparison.

More in particular I have studied the following questions:

The influence of various C sources.
,, ,, ,, ,, N ,,
,, ,, ,, ,, pH conditions.
,, ,, ,, the element of calcium, if the latter is given instead of potassium.

I regret that I lacked time to apply calcium in addition to potassium, in this way obtaining a better insight in the part which calcium plays in this group. Of late years it has become clear that calcium plays a much more important part in the nutrition of fungi than formerly was accepted.

§ 2. *Method.*

The fungus was cultivated in nutritive solutions in Erlemeyers flasks, 20 series of 8 flasks of each were prepared, each flask containing 25 c.c.

Every week I investigated one flask of each series for the macro- and miciroscopic characters and the dry-weight of the fungus and the pH of the liquid. The various initial pH's were obtained by the different proportions of the fosfates on the understanding, that in all cases the PO_4 content was the same.

The inoculation occurred by introducing into each flask 1 c.c. of a spore-suspension. The cultures obtained in this way could easily be compared.

For the microscopic investigation the fungus was coloured with methylen-blue, as cotton-blue gave no results. The pH's were found in a comparator with the aid of the following indicators:

Bromcresolgreen	(3.8—5.4.)
Chlorphenolred	(5.6—6.6.)
Bromthymolblue	(6.8—7.4.)
Cresolred	(7.6—9.2.)

The dry-weights were fixed on carbon papers, weighed before hand and which before the weighing had lain in an incubator of 40° C for three days. This is sufficient for an exact dryweight, as experience has taught us.

§ 3. *Discussion of results:*

The results are given in table I. The first column shows the composition of the nutritive solutions, the numbers of each series with the pH belonging to it. The values of the dryweights and the pH's are given in the following columns from the first to the seventh week after the beginning of the investigations.

As is obvious from the table I have chosen as a basis *Richards solution* of which I have prepared 5 series with different pH (A).

I changed the carbo-hydrate by taking saccharose (B) and amylum (C) both of them with series of a different pH, instead of glucose, the original carbo-hydrate of the Richards.

For the series D, E, F I have used other nitrates, taking care that in each case the same amount of NO_3 concentration was given.

The series G, H, I contain a double quantity of phosphates G for the rest being equal to A, H provided with NH_4NO_3, I with $(NH_4)_2SO_4$ as a source of nitrogen. In these cases the total amount of nitrogen was the same.

For the sake of clearness I will henceforth call A the Richards group, and the other groups after the compounds in which they differ from A.

Richardsgroup (A).

In this group Actinomyces already at the end of the first week showed a development of films on the surface as well as a development in the liquid. The submerged colonies soon clung to the wall and the bottom of the flask. The floating ones white at first through the conidia, became greyish after 2 or 3 weeks and pits

Figure 1. Submerged mycelium showing clear septs. Group A. pH = 9,3. 3 weeks old. 800 ×

were formed, containing a dark yellow liquid. After 4 weeks the colonies began to fuse. The best development was obtained when the initial pH was about 7. The microscopical examination showed a well developed and ramified mycelium, in few cases provided with clear septs (fig. 1). Also the corkscrew shape could be observed. The diameter of the hyphe varied, between 0.6 and 1.2 μ, that of the round spores between 1 and 1.5 μ. I could ascertain that sporogenesis begins at the tips of fertile branches and proceeds basipetally; this phenomenon has already been mentioned by Drechsler. (fig. 2).

By high (9,3) and low (4,3) pH the mycelium divided itself into small pieces (length 2,8μ) which resemble bacteria (fig. 3—4).

In course of time the value of the pH diminished as can be seen in table I. The development was not very abundant. At a pH of 4,3 there was no growth at all.

Saccharose-group (B)

Instead of the powdery forms as with (A), the cultures had a

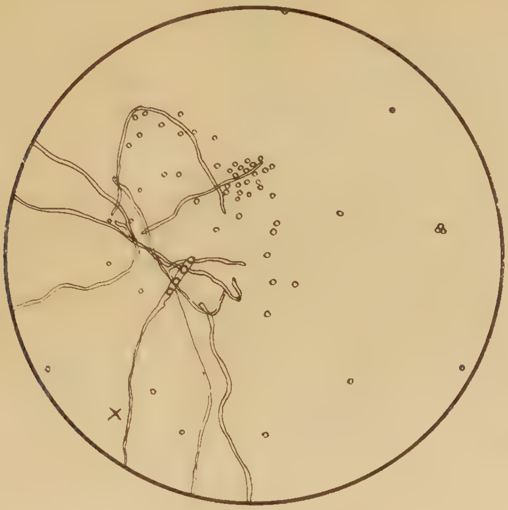


Figure 2. Top of hypha (marked x) is somewhat swollen. In it spores are visible, Group A. pH = 7,6. 4 weeks old. 800 ×

fluffy appearance. With pH 6,1, 6,3 a red discolouring of the liquid occurs. No diffusion of the cultures. Growth on the surface as well as below minimal. The floating mycelia show irregularly spread pits with colourless liquid. With the pH's between 6,- and 7,2, we find the best growth and fructification already after a week. Very remarkable is the fact that the conidia remain hanging together in chains for a long time (fig. 5). It may also occur that the wall of the sept seems to dissolve while the protoplasm concentrates itself in certain places. This can very intensively be

coloured with methylenblue and finally makes itself free (fig. 6). The conidia in most cases are oval, sometimes however round, length 1,8—2 μ, the thickness of the hypheae 1,2—1,4 μ. Sometimes septs were noticed. The pH changes little (scant growth) with a tendency to increase. The dry-weights are somewhat inexact on account of a precipitation occurring in the flasks.

Figure 3. By high pH the hyphae begin to divide themselves into smaller pieces after 4 weeks. Group A. pH = 9,0. 4 weeks old. 800 ×

Amylum-group (C)

Strong, regular growth, are first powdery white; after a week already faintly greyish. They have a diameter of 3 to 4 m.m. and show growing rings (4 at optimal pH 7,2). In the end diffusion.

In the second week sclerotia are formed, that cannot be coloured with methylenblue and are yellowishly tinged.

In one series 2, 3, 4 hypheae spores had been formed in a flask after 7 weeks (fig. 7). Septs were found in some cases. Fructification occurred already in the first week; conidia round; diameter 1—1,2 μ, the thickness of the hypheae is 0,9 μ. The pH increases

regularly. In cases of maximal growth the dry-weight reaches its optimum in the 6th. week.

Figure 4. With low pH the hyphae break up into small pieces (splits). Group A. pH = 5,1. 6 weeks old. 800 ×

$Ca(NO_3)_2$ — amylum group: (D)

Is among the investigated media the most ideal. The growth is abundant. Already after a week sclerotia. On the surface of

Figure 5. It is typical for this group, that the conidia remain together in chains for a long time. Group B. pH 5,8 5 weeks old. 800 ×

the liquid a film of oildrops is formed. The conidia are ± oval. Length 1,8 μ. The thickness of the hypheae 1,2 μ. The pH is increased from 6,6—8,5 μ. The optimal-weight occurs in the 6th. or 7th. week.

$Ca(NO_3)_2$ Saccharose group (E)

The results are not fundamentally different from that of the

Figure 6. From the hypha marked x the cell wall has become very thin, while the plasm has been concentrated in some places, (page 50) After some time the cell-wall disappears altogether and the plasm comes free. Compare also fig. 8. Group B. pH = 5,8. 5 weeks old. 800 ×

B-group. Only the degeneration of the hypheae occurs at an earlier period (fig. 8). Conidia are round, hypheae 0,8 μ, thick septs. It seems that calcium here promotes an early reaching of the optimum (premature ripening).

NH_4NO_3 group (F)

After a week no conidia; yet after the first week the pH has decreased from 6,1 to 3,9. Now we notice the breaking up into

short hypheae (oidia) as described under A. The series became infected so that other informations are lacking.

Amylum-double phosphate group (G)

Growth abundant and very regular. Colonies numerous, remain small, but diffuse already after 2 weeks into a thick layer. The

Figure 7. Four, three and two hypha spores. At (X); a hypha from which such a spore develops. Group C. 7 pH = 8,—. 7 weeks old. 800 ×

submerged mycelium soon fixes itself. This image does not change. The round conidia have a diameter of 1,7 μ, hypheae are 1,2 μ wide. Dry-weight is maximal after 2 weeks. The pH increases from 6,4 to 7,5.

NH_4NO_3 double phosphate series (H):

Less abundant growth. No diffusion into a film, also submerged mycelium. The floating colonies squeeze out a yellowish liquid At pH 5,1 a breaking up into short hypheae occurs, which afterwards grow out again. Formation of sclerotia, conidia round 1,5 μ, hypheae 1,2 μ. The pH decreases from 6,4 down to 5,3.

$(NH_4)SO_4$ doublephosphate series (I)

Scant growth. Little fructification. Hypheae thin. No measures were taken. After 6 weeks degeneration was noticed. The pH decreased from 6,5 down to 4,8.

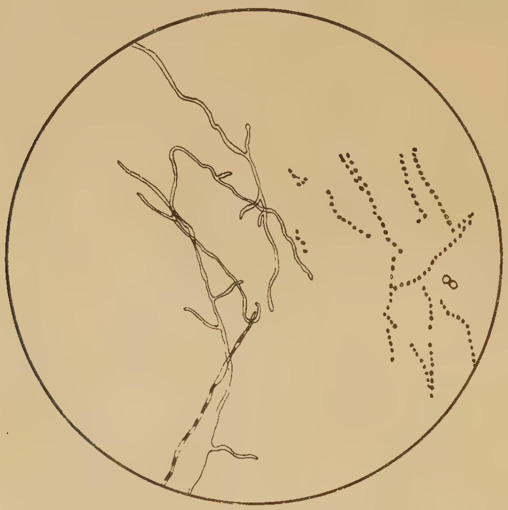


Figure 8. From various hyphae the walls have disappeared and only grains of protoplasm remain. In between two conidia. Group E. pH = 6,2. 7 weeks old. 800 ×

CONCLUSION

In artificial cultures the morphology and dry-weight of Actinomyces maculatus Millard were investigated by varying the C and N sources by varying the pH and by studying the influence of Ca

1. Amylum proved an excellent C source, glucose gives a much smaller development, whereas the fungus grows scantily on saccharose.

2. If the N is given in the form of KNO_3, development is abundant; with NH_4NO_3 however the solution soon becomes acid and thus probably inhibits the growth. $(NH_4)_2SO_4$ practically

GROUPS	Nr. of the Series and pH	DRYWEIGHTS AND pH AFTER 1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks	7 weeks
A 10 gr. KNO_3	VIII 4,3	no development						
5 gr. KH_2PO_4	VI 6,1	20 mg 6,1	— 6,2	19 mg 6,3	41 mg 6,3	67 mg 5,7	67 mg 5,3	49 mg 5,1
2,5 gr. $MgSO_4$	VII 6,4	25 mg 6,6	— 6,4	5 mg 6,5	39 mg 6,6	62 mg 6,6	81 mg 6,4	84 mg 5,3
20 mg $FeCl_2$	I 7,1	34 mg 7,3	3 mg 7.3	114 mg 7,4	89 mg 7,6	75 mg 7,3	60 mg 5,1	— —
30 gr. glucose 1000 cc H_2O	V 9,3	— —	— —	6 mg 9,3	0 mg 9,0	8 mg 8,7	37 mg 8,3	25 mg 8,4
B 10 gr. KNO_3	XI 4,0	no development						
5 gr. KH_2PO_4	XII 5,5	17 mg 5,9	— 5,9	7 mg 5,9	9 mg 6,1	29 mg 5,8	6 mg 5,8	91 mg (?) 5,8
2,5 $MgSO_4$	X 6,0	20 mg 6,1	— 6,2	— 6,1	— 6,3	1 mg 6,2	28 mg 6,1	14 mg 6,1
20 mg $FeCl_2$	IX 7,2	13 mg 7,3	— 7,3	19 mg 7,2	35 mg 7,3	— 7,6	43 mg 7,2	69 mg and 23 mg 7,9 and 7,2
30 gr. saccharose 1000 cc H_2O	XIII 8,1	32 mg 7,9	3 mg 7,9	6 mg 7,9	6 mg 7,9	43 mg 7,9	14 mg 7,9	22 mg 7,9
C 10 gr. KNO_3	XIV 4,5	no development						
5 gr. KH_2PO_4	XVIII 5,7	3 mg 5,9	16 mg 6,0	72 mg 6,2	76 mg 6,4	86 mg 6.4	126 mg 6,5	108 mg 6,7
2,5 gr. $MgSO_4$ 20 mg. $FeCl_2$	XV 6,5	65 mg 6,7	50 mg 6,9	101 mg 6,9	128 mg 7,6	165 mg 7,9	157 mg 8,1	127 mg 8,0
30 gr. amylum solubile 1000 cc H_2O	II 7,2	17 mg 7,6	47 mg 7,9	82 mg 7,9	200 mg 8,3	179 mg 8,4	196 mg 8,5	138 mg 8,7

D 8 gr. $Ca(NO_3)_2$ 5 gr. KH_2PO_4 2,5 gr. $MgSO_4$ 20 mg. $FeCl_2$ 30 gr. amylum solubile 1000 cc H_2O	XVII 6,6	72 mg 6,4	89 mg 7,3	137 mg 7,2	159 mg 7,6	277 mg 8,3	258 mg 8,5	191 mg 8,7
E 8 gr. $Ca(NO_3)_2$ 5 gr. KH_2PO_4 2,5 gr. $MgSO_4$ 20 gr. $FeCl_2$ 30 gr. saccharose 1000 cc H_2O	XVI 6,4	1 mg 6,5	10 mg 6,4	0 mg 6,4	2 mg 6,3	28 mg 6,4	29 mg 6,4	33 mg 6,2
F 8 gr. NH_4NO_3 5 gr. KH_2PO_4 2,5 gr. $MgSO_4$ 20 mg. $FeCl_2$ 30 gr. glucose 1000 cc H_2O	IV 6,1	8 mg 3,9	4 mg 4,4	— —	— —	— —	— —	— —
G 10 gr. KNO_3 10 gr. KH_2PO_4 2,5 gr. $MgSO_4$ 20 mg. $FeCl_2$ 30 gr. amylum solubile 1000 cc H_2O	XX 6,4	— —	— —	88 mg 6,8	88 mg 7,0	83 mg 7,1	89 mg 7,6	180 mg (?) 7,5
H 8 gr. NH_4NO_3 10 gr. KH_2PO_4 2,5 gr. $MgSO_4$ 20 mg $FeCl_2$ 30 gr. amylum solubile 1000 cc H_2O	XXI 6,4	— —	— —	12 mg 5,6	33 mg 5,7	41 mg 5,1	32 mg 4,9	112 mg (?) 5,3
I 8 gr. $(NH_4)_2SO_4$ 10 gr. KH_2PO_4 2,5 gr. $MgSO_4$ 20 mg. $FeCl_2$ 30 gr. amylum solubile 1000 cc H_2O	XXII 6,5	— —	— —	0 mg 5,9	0 mg 4,9	0 mg 5,0	0 mg 4,8	— —

yields no development. From these facts we may conclude, that ammonia cannot be used as a N source.

3. The optimal pH lies near the neutral point. During the development of the fungus it increases, except in cases where NH_4NO_3 and $(NH_4)_2SO_4$ was found in the nutritive solution applied.

4. If Ca is given instead of K, the growth is faster; fructification occurs sooner with glucose- or amylum-nutrition, while with saccharose, on which the development with KNO_3 is minimal, the stadium of fructification is sooner reached.

5. The influence on the morphology of the fungus is shown by the drawings.

LITERATURE CITED.

J. DUCHÉ, Les Actinomyces du Groupe albus.
1934, Paris.

KRAINSKY, A., Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur.
1914, Centralblatt für Bact., Parasit und Infectionskrankh. Bd. XLI.

LIESKE, R., Morphologie und Biologie der Strahlenpilze.
1921, Leipzig.

MILLARD, W. A. and BURR, S., A study of Twenty four strains of Actinomyces and their Relation to Types of common scab of Potato.
1926, The Annals of applied Biology, Vol. XIII.

WAKSMAN, S. A., Cultural Studies of species of Actinomyces.
1919, Soil Science Vol. VIII.

WAKSMAN, S. A. and JOFFE, Journ. of Bacteriology.
1919, IV and 1920 V.

WAKSMAN, S. A. and CURTIS, R. E., The Actinomyces of the soil.
1916, Soil Science I.